



Exposition néonatale aux œstrogènes : effets sur leur métabolisme, le développement ovarien et la fonction de reproduction chez la ratte

Clémentine Chalmey

► To cite this version:

Clémentine Chalmey. Exposition néonatale aux œstrogènes : effets sur leur métabolisme, le développement ovarien et la fonction de reproduction chez la ratte. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1S107 . tel-00953657

HAL Id: tel-00953657

<https://theses.hal.science/tel-00953657>

Submitted on 28 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE | UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

École doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Clémentine CHALMEY

Préparée à l'IRSET INSERM U1085

Institut de Recherche sur la Santé l'Environnement et le Travail

Équipe « Environnement Viral et Chimique & Reproduction »

UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

Thèse soutenue à Rennes

le 27 novembre 2013

devant un jury composé de :

**Exposition néonatale aux
œstrogènes :
Effets sur leur métabolisme, le
développement ovarien et la
fonction de reproduction chez
la ratte**

Corinne COTINOT

Directeur de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Rapporteur

Nadine BINART

Directeur de recherche, INSERM, Le Kremlin-Bicêtre

Rapporteur

Célia RAVEL

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Rennes

Examineur

Nouredine BOUJRAD

Professeur des Universités, Rennes

Examineur

Eric HOUDEAU

Directeur de recherche, INRA, Toulouse

Examineur

Séverine MAZAUD-GUITTOT

Chargée de recherche, INSERM, Rennes

Co-directeur de thèse

Alain LEGRAND

Professeur émérite de Pharmacologie, Rennes

Co-directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Docteurs Corinne Cotinot et Nadine Binart qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au Docteur Eric Houdeau et aux Professeurs Célia Ravel et Nouredine Boujrad, examinateurs de ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail - Unité INSERM 1085. Je remercie le Docteur Bernard Jégou, Directeur de l'IRSET, et le Docteur Nathalie Dejucq-Rainsford, qui dirige l'équipe « Environnement Viral et Chimique et Reproduction », de m'avoir accueillie au laboratoire. Je remercie le Docteur Françoise Bauché, directrice de ma thèse au cours de la première année, puis le Professeur Alain Legrand qui en a pris la direction par la suite ainsi que le Docteur Séverine Mazaud-Guittot qui en a assuré la co-direction au quotidien. Merci Séverine pour la formation rigoureuse et les précieux conseils que tu m'as donnés, pour ta confiance et ta capacité à me faire aller toujours plus loin.

Merci aussi à mon tuteur de thèse, le Docteur Denis Chrétien, et tous les membres du Comité de Thèse qui m'a suivie pendant 3 ans : les Docteurs Solange Magre, Karine Morcel, Fabrice Nesslany et Gilles Salbert, pour leur regard neuf sur ce projet de thèse, les questions-pièges et les suggestions.

Je tiens aussi à remercier l'équipe du laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille qui non seulement m'a accueillie pour un stage de Master 1 mais a recommencé quatre ans plus tard en me permettant de venir faire à l'IPL les expériences de génotoxicité. Merci à Fabrice Nesslany, Sophie Simar et sa carte de cantine, Lauren Nakab et sa bonne humeur qui traverse les couloirs du labo, Gwendoline Dewaele pour son amitié et son soutien logistique sans faille, Gonzague Dourdin le spécialiste des manip' *in vivo* et Smaïl « Comet » Talahari pour leur aide technique, et bien sûr tous les autres ainsi que les « p'tits nouveaux » ! Je remercie également le Docteur Frank Giton, de l'IMRB de Créteil, qui a réalisé les dosages de stéroïdes par GC/MS-MS.

Je voudrais remercier aussi les personnes qui m'ont permis de découvrir le monde de la recherche lors de mon tout premier stage : Hélène Mülh, qui m'a recommandée sans hésiter, Émilie et Odile Barras pour leur hébergement, et toute l'équipe du laboratoire de Génétique du Développement Humain de l'Institut Pasteur de Paris. Merci à tous et en particulier au Docteur Debbie Montjean, ma « marraine de thèse ».

Merci également aux membres des différentes équipes pédagogiques qui m'ont accueillie ces 3 dernières années et m'ont donné l'occasion de m'essayer à l'enseignement, ainsi qu'à tous mes étudiants. C'est une expérience vraiment positive et enrichissante (et ça fait du bien quand les manip' ne marchent pas !).

Une thèse, c'est aussi l'occasion de faire des rencontres inoubliables... Merci à tous les membres du labo, ce fut un plaisir de travailler avec vous chaque jour (même le week end) et ça n'est pas encore

fini ! Merci à Isa, Anne-Pascale, Véro et Cath, sans qui on est bien démuni dès que quelque chose cloche au labo. Merci à APS et Christine K avec qui j'ai partagé mes misères d'animalerie, Dominique et Florence pour leur sollicitude et la relecture de certaines parties de ce manuscrit, Christèle et Laurianne L pour leurs réponses à mes innombrables questions et les manip' partagées, et les épidémiologistes Nathalie C et Tania !! Merci à Fred pour son aide sur les projets « microarrays » (merci aussi pour les bonbons et on s'excuse pour les débats traumatisants !).

Merci aussi à Emmanuelle et Anna (pour sa passion pour les BN et la garde alternée harmonieuse de notre dérouleur de scotch commun depuis plus de 2 ans) et une pensée particulière pour Mymy...

Ces 4 dernières années auraient été bien différentes sans les Vieilles Meufs de la première heure, scientifiques souples et dégagées en toutes circonstances : Océane, chef de file de l'esprit VM, toujours prête à dégainer son pipeau magique en cas de crise existentielle ; Claire, VM capillairement excentrique toujours partante pour aller essayer des fringues improbables ; Marina, VM maternelle, reine de l'organisation des apéros dinatoires de dernière minute (ou des barbecues, selon la saison) et Céline, parce qu'on a commencé au labo ensemble et on finira (presque) ensemble et aussi parce que malgré son côté chonchon, c'est la personne la plus optimiste de la terre ! Les filles, merci pour tout ! Pour les soirées psychothérapies au QG, pour les virées chez Mickey, pour les thérapies par le chant, pour m'avoir offert un chat roux, pour le « mannoual de poney », pour les débats philosophiques sur la hiérarchie cosmique qui aboutissent toujours aux mêmes conclusions mais qu'on ne se lasse jamais de refaire parce que ça nous fait pleurer de rire. Je pourrais vous remercier aussi pour les vrais débats scientifiques / méthodologiques, les questionnements partagés sur nos projets respectifs, les échanges de bons procédés en manip'... Mais ce sont tous les petits « à-côté » qui rendent la vie plus belle (et la thèse plus agréable)! J'en profite pour remercier aussi CNN, homme VM assumé, toujours rigoureux mais jamais avare en critique musicale (ou pas) assassine. Des VM partent et d'autres arrivent, la nouvelle garde vend évidemment du rêve aussi : Dédé, Millissia (au fait, bon courage !) et Lauriane S (ma copine d'ovaire dans cette unité testiculaire). On n'a pas encore fini de se retrouver au QG pour refaire le monde... Merci les filles de m'avoir supportée tout au long de la rédaction ! Je ne pouvais pas oublier non plus ma jumelle de thèse, Clémentine P, avec qui j'ai tellement plus en commun que notre prénom !

Merci à mes amies de toujours, Virginie et Lucie : après presque 20 ans d'amitié et bien qu'on ait pris des chemins différents, c'est toujours un plaisir de se retrouver. Merci aussi à Alexia et Alexandra.

Enfin je voudrais remercier ma famille au grand complet, de l'Est et de l'Ouest (et un peu entre les deux), qui m'a laissée partir pour faire mes études, travailler loin d'elle et lui consacrer si peu de temps... Malgré l'éloignement, je pense bien à vous tous et j'espère pouvoir bientôt revenir vous voir...

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	5
Listes des figures et tableaux	9
Avant-propos	13
Introduction	15
I. L'ovaire	17
1. L'ovaire embryonnaire et fœtal	17
A. Différenciation précoce de l'ovaire	17
B. Les cellules somatiques ovariennes	19
C. La cellule germinale dans l'ovaire fœtal.....	19
i. Cellules germinales primordiales – Migration et colonisation	19
ii. Ovogonies – Mitoses	21
iii. Ovocytes – Méiose	21
iv. Évolution du nombre de cellules germinales pendant la vie fœtale.....	25
2. Formation des follicules ovariens.....	25
A. Processus morphogénétiques	27
i. Remodelage de la membrane basale	27
ii. Homéostasie ovocytaire	27
B. Dialogue entre cellules somatiques et germinales : régulation paracrine de la formation folliculaire	33
i. Kit ligand / c-kit et voie Pi3K / Akt	33
ii. Système Notch.....	33
iii. Neurotropines	34
iv. Facteurs de croissance de la famille du TGFβ	34
v. Facteurs de transcription	35
vi. Facteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire.....	35
C. Théorie du contrôle endocrine de la formation folliculaire	37
i. FSH.....	37
ii. Progestérone	37
iii. Œstrogènes / œstradiol.....	39
3. L'ovaire immature	43
A. La croissance folliculaire.....	43
i. Transition follicule primordial / follicule primaire	43
ii. Croissance folliculaire terminale	45
iii. Première vague de croissance folliculaire	47
B. Maturation du système central et mécanismes de la puberté	56
C. La puberté : critères cliniques et établissement de la cyclicité.....	57

4.	L'ovaire mature	59
A.	Gestion du stock d'ovocytes : dynamique de recrutement	59
B.	Compétence méiotique et ovulation.	61
C.	L'ovaire endocrine et sa place dans la régulation de la fonction de reproduction.....	63
i.	L'ovaire régulé par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.....	63
ii.	Les hormones ovariennes.....	65
iii.	Régulations globales de l'axe reproducteur en fonction du cycle	71
D.	Sénescence reproductive	75
E.	Pathologies de l'ovaire adulte	77
II.	Les œstrogènes.....	79
1.	Le rôle des œstrogènes dans différentes fonctions	79
2.	Les récepteurs des œstrogènes.....	79
A.	Découverte et structure	79
B.	Mode d'action et signalisation via les récepteurs des œstrogènes	83
3.	La biosynthèse des œstrogènes	83
4.	Le métabolisme des œstrogènes.....	85
A.	Phase 1 : Fonctionnalisation.....	87
B.	Phase 2 : Conjugaison.....	91
C.	Phase 3 : Transport, excrétion.....	95
D.	La maturation du système	99
5.	Atteintes de l'ADN	105
A.	Adduits et cassures.....	105
B.	Altérations épigénétiques	107
III.	Les perturbateurs endocriniens.....	111
1.	Le système endocrinien et ses perturbateurs	111
2.	Historique	111
3.	Types de molécules et voies d'exposition	113
4.	Mode d'action	117
5.	Origine périnatale des pathologies de l'adulte	117
6.	Dysfonctionnements reproductifs et œstrogènes	119
A.	Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur les capacités de reproduction	119
B.	Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur l'ovaire	121
C.	Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur l'hypophyse et l'hypothalamus	123
D.	Facteurs influençant la gravité des conséquences d'une exposition néonatale aux PEO.....	125
IV.	Problématique et stratégie expérimentale	127
	Matériel et Méthodes.....	129
I.	Les animaux.....	131
1.	Origine	131
2.	Entretien de l'élevage.....	131
3.	Traitement pour expérimentation	131
4.	Accord du comité d'éthique local.....	133
II.	Les méthodes.....	133
1.	Plan expérimental.....	133
2.	Suivi physiologique	133
3.	Euthanasie	135
4.	Dissection	135
A.	Animal de moins de 6 jours.....	135

B.	Animal de 21 jours et plus	137
5.	Biologie moléculaire	137
A.	Extraction d'ARN et transcription inverse sur tissus congelés à sec	137
B.	PCR conventionnelle et PCR quantitative.....	139
i.	PCR conventionnelle (et électrophorèse)	139
ii.	qPCR.....	141
C.	Dosages hormonaux.....	145
i.	Dosages des gonadotropines : ELISA.....	145
ii.	Dosage des stéroïdes : GC/MS-MS.....	145
D.	Puces / microarrays	147
i.	Contrôle qualité des ARN	147
ii.	Puces « Affymetrix ».....	149
6.	Histologie.....	151
A.	Fixation paraformaldéhyde 4 %, inclusion, coupes.....	151
B.	Fixation Bouin, inclusion, coupes	153
C.	Immunohistochimie.....	153
D.	Hybridation <i>in situ</i>	155
i.	Synthèse de ribosondes.....	157
ii.	Hybridation <i>in situ</i>	159
E.	Couplage HIS / IHC (IF).....	161
F.	Marquage des cellules en apoptose.....	161
i.	Terminal deoxynucleotidyl transférase (TdT) dUTP Nick End Labeling (TUNEL).....	161
ii.	Apoptag	163
G.	Acquisition d'images et comptages cellulaires.....	163
H.	Test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)	165
7.	Statistiques	167
	Résultats	169
I.	Exposition néonatale aux œstrogènes et conséquences à court terme sur leur métabolisme et l'histogenèse des follicules ovariens	170
1.	Résumé	170
2.	Publication.....	171
3.	Résultats annexes.....	175
II.	Exposition néonatale aux œstrogènes et conséquences à long terme sur l'ovaire	177
1.	Introduction.....	177
2.	Matériel et Méthodes	178
3.	Résultats	179
4.	Discussion	182
III.	Exposition néonatale aux œstrogènes et altérations génétiques et génomiques.....	195
1.	Introduction.....	195
2.	Matériel et méthodes.....	196
3.	Résultats	197
4.	Discussion	202
	Discussion générale et Perspectives.....	216
I.	Les contraintes liées au travail sur animal néonatal	217

II. Les avantages de ce modèle <i>in vivo</i>	217
1. Réponse métabolique	217
2. Réponse physiopathologique	218
III. Altération de la communication entre cellule germinale et cellules somatiques	219
IV. Extension aux perturbateurs endocriniens	220
V. L'héritabilité des dommages liés à l'œstrogénisation néonatale.....	221
VI. Comparaison inter-espèces : extrapolation à l'Homme ?.....	222
1. Variations inter-espèces : cas des rongeurs.....	223
2. Variations inter-espèces : petits mammifères versus gros mammifères.....	223
3. Primates.....	224
4. Des modèles de laboratoire à l'Homme.....	224
A. Formation folliculaire et milieu endocrine	225
B. Fertilité et cancérogenèse	226
C. Héritabilité.....	227
D. Complexité des expositions humaines : doses et voies d'exposition.....	228
Conclusion	229
Références bibliographiques.....	231

Liste des abréviations

°C	degrés Celsius	C2, C4, C16	Carbone 2, carbone 4, carbone 16
µg	micro-gramme	COMT	Catechol-O-MethylTransferases
µl	microlitre	Ct	Cycle threshold
17bHsd	17bêta-hydrostéroïde déshydrogénase	CTD	Comparative Toxicogenomic Database
3bHSD	3bêta-hydrostéroïde déshydrogénase	CXCL12	(voir SDF1)
A	Adénine	CXCR4	Récepteur à SDF1
ABC	Avidin-Biotin-Complex	Cyp	Cytochrome
ABC-transporter	ATP-Binding Cassette Transporters (ABC transporteurs)	Cyp11a1	Cytochrome P450, famille 11, sous-famille A, membre 1 (voir ssc)
Act	Activine	DAB	3-3' Diamino benzidine
ActR	Récepteur des activines	DAI	Daidzeine
ADN	Acide Désoxyribonucléique	Dax1	dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire	Dazl	Deleted in azoospermia-like
Afp	Alpha-foetoprotéine	ddCT	double delta cycle threshold
AKT	kinase spécifique des Sérine/thréonine	DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
AMEN	Annotation, Mapping, Expression and Network	DEPC	Diethyl pyrocarbonate
Amh	Anti-Mullerian Hormone / Hormone anti-mullérienne	DES	Diethylstilbestrol
AmhRII	Récepteur de l'hormone anti-mullérienne	DIG	Digoxygénine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	DNase	Désoxyribonucléase
ANOVA	Analysis Of Variance	Dnmt1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
ARC	Noyau hypothalamique arqué	dNTP	dinucléotide triphosphate
ARN	Acide ribonucléique	DO	Densité Optique
ARNm	Acide ribonucléique messenger	Dpp6	dipeptidyl-peptidase 6
Atm	Ataxia Telangiectasia Mutated	E	Œstradiol
ATP	Adénosine Triphosphate	E1	Œstrone
Atr	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related	E1-S	Œstrone-sulfate
Bax	Bcl2-associated-X-protein	E2	17b-oestradiol
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate	E2-S	17b-estradiol sulfate
Bcl2	B-cell-lymphoma 2	EAP-1	Enhanced at Puberty 1
Bcrp	Breast Cancer Resistance Protein	EB	Œstradiol Benzoate
Becn1	Beclin1	EC	Œstradiol Cypionate
BET	Bromure d'Ethidium	Ednrb	endothelin receptor type B
Bmp	Bone morphogenetic protein	EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
BPA	Bisphénol A	EE	Ethynilestradiol
BSA	Bovine serum Albumin	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
BSEP	Bile Salt Export Pump	Emx2	Empty spiracles homeobox 2
C	Cytosine		

ER	Estrogen Receptor	HHG	Hypothalamo-hypophyso-gonadique
Era	Récepteur aux œstrogènes de type a (voir Esr1, NR3A1)	HIS	Hybridation <i>in situ</i>
Erb	Récepteur aux œstrogènes de type b (Voir Esr2, NR3A2)	Hnrnpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
ERE	Estrogen Response Element, Elément de réponse aux Œstrogènes	hOGG	human oxoguanine glycosylase
ERO	Espèce réactive de l'oxygène	Hox	Homeobox
ERR	Estrogen Related Receptor	HSD	Hydroxysteroid deshydrogenase
ERαKO	knock-out pour le récepteur alpha des œstrogènes	IF	Immunofluorescence
ERαβKO	knock-out pour les récepteurs alpha et bêta des œstrogènes	IHC	Immunohistochimie
ERβKO	knock-out pour le récepteur bêta des œstrogènes	Inh	Inhibine
Esr1	Estrogen Receptor 1 (Era, NR3A1)	Inha	Inhibine alpha
Esr2	Estrogen Receptor 2 (Era, NR3A2)	IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
EV	Œstradiol Valerate	Isyna1	inositol-3-phosphate synthase 1
Fgf7	Fibroblast Growth Factor 7	JPC	jours post-conception
Figla	Facto in the germ line a	JPN	jours post natal
Foxo3a	Forkheadbox O3	Kiss	Kisspeptide
FSH	Follicle Stimulating Hormone	KissR	Kisspeptide récepteur
Fst	Follistatine	KO	knock-out
Fxna	Felix-ina	LB	Luria Broth
G	Guanine	LDS	Last Significant Difference
G	gauge	LH	Luteinizing Hormone
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	Lhx9	LIM homeobox 9
Gdf9	Growth differentiation factor	Lif	Leukemia inhibitory factor
GEN	Génistéine	Lm1	Lymphomyeloid antigen 1
GGT	Gamma-glutamyl-transpeptidase	LMPA	Low Melting Point Agarose
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone	M33	Mouse polycomb
GO	Gene Ontology	MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
GPER	récepteur des estrogènes couplé à la protéine G	Mdr	Multidrug Resistance Protein
GperKO	Knock-out pour le récepteur des œstrogènes couplé à la protéine G	mg	milligramme
GPR30	voir GPER	min	minute
Gpr54	Kisspetin-receptor	ml	millilitre
GSH	Gluthation	mm	millimètre
GST	Gluthation S transferase	mM	millimolaire
H	Huile (de maïs)	M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
hCG	human Chorionic Gonadotropine	MMS	Methylmethane Sulfonate
		MOF	Multi-oocyte-follicle (follicule multi ovocytaire)

Mrp	Multidrug Resistance Associated Protein	Pi3K	Phosphatidyl-inositol 3 kinase
Msy2	Voir Ybx2	PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	POD	Peroxydase
Nano	Nanomouse	Psmb9	proteasome subunit, beta type, 9
Nanog	Nanog homeobox	PTEN	phosphatase and tensin homolog
NBT	Nitro Blue Tertrazolium	PVAV	noyau périventriculaire antéro-ventral
NCBI	National Center for Biotechnology Information	PXR	Pregnane X Receptor (voir Nr1i2)
ng	nanogramme	qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
Ngf	Nerve Growth Factor	RES	Resveratrol
nm	nanomètre	Rfpl4	ret finger protein-like 4
nM	nanomole	RIN	RNA Integrity Number
Notch2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	RNAse	Ribonuclease
NR1i2	Nuclear receptor 1i2 (voir PXR)	Rpa	replicative protein A
NR3A1	Nuclear receptor 3A1 (voir Esr1 et Era)	rpm	rotation par minute
NR3A2	Nuclear receptor 3A2 (voir Esr2 et Era)	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
NTE	NaCl - Tris - EDTA	Rspo1	R-spondin-1
Oat	Organic Anion Transporter	RT	Reverse Transcription
Oatp	Organic Anion Transporting Polypeptide	RU486	mifepristone
OCT	Organic Cationic Transporter	Scarb1	scavenger receptor class B 1
Oct4	POU5f1, POU class 5 homeobox 1	SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
OCTN	Organic Cation/Carnitine Transporter	Scp	Synaptonemal Complex
P ou P4	Progestérone	Sdf1	voir CXCL12
p450ssc	Cyp side chain cleavage enzyme (voir Cyp11a1)	SEM	Standard Error of the Mean
p53	tumor suppressor	SF1	Splicing Factor 1
PAF	Paraformaldéhyde	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
PAPS	phosphoadenosine 5'-phosphosulfate	SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
PBS	Phosphate Buffer Saline	SLC	Solute Carrier
PCB	Polychlorobiphényl	SOPK	Syndrome des Ovaires Polykystiques
PCNA	Proliferative Cell Nuclear Antigen	Sox9	SRY-box containing gene 9
PCR	Polymerase chain reaction	Spo11	meiotic protein covalently bound to DSB
	réaction de polymérisation en chaîne	Sry	sex determining region Y
Pdk1	Phosphoinositide-dependent kinase 1	Star	Steroidogenic Acute Regulatory protein
	Perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique	Stra8	stimulated by retinoic acid gene 8
PEO		SULT	sulfotransferase
pg	picogramme	SVF	Serum de veau fœtal
PGD2	6-phosphogluconate dehydrogenase2	T	Testostérone
P-gp	Phosphoglycoprotéine		

T	Thymine
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBS	Tris Buffer saline
TCDD	Tétrachlorodibenzodioxine
TEA	Triethanolamine
TESPA	TriEthoxySilylPropylAmine
Tiar	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Ubc	ubiquitine C
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	récepteur des VLDL
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4
Wt1	Wilms tumor 1
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
Ybx2	Y-box binding protein 2 - Voir Msy2
Zar1	zygote arrest 1
ZEA	Zéaralénone
Zfx	zinc finger protein X-linked
Zp	Zone pellucide

Listes des figures et tableaux

Figures

	INTRODUCTION	Page
Figure 1	Régulation simplifiée de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique femelle	12
Figure 2	Contrôle génétique précoce de la différenciation sexuelle	16
Figure 3	Différenciation du tractus génital (chez le rongeur)	16
Figure 4	Facteurs induisant la formation des cordons ovariens	18
Figure 5	Les divisions de la cellule germinale chez la ratte	20
Figure 6	Évolution du nombre de cellules germinales en période fœtale et néonatale chez la ratte	24
Figure 7	Chronologie comparée de la fin de morphogenèse ovarienne chez la ratte et la femme	24
Figure 8	Facteurs induisant la formation des follicules primordiaux	26
Figure 9	Schéma simplifié des voies de l'apoptose	28
Figure 10	Schéma simplifié du processus d'autophagie	30
Figure 11	Voies de signalisation cellulaire	32
Figure 12	Taux maternels circulants de 2 œstrogènes (œstradiol et œstrone) au cours de la gestation chez la ratte, la femme et la vache	38
Figure 13	Initiation de la croissance folliculaire	42
Figure 14	La croissance folliculaire	44
Figure 15	Développement post-natal chez la ratte	52
Figure 16	Survenue de la puberté	54
Figure 17	Cycles estriens chez la ratte	58
Figure 18	Recrutement et développement folliculaire dans l'ovaire mature	60
Figure 19	Régulation de la croissance folliculaire	62
Figure 20	Les 3 niveaux de régulation exercée par l'ovaire	64
Figure 21	Inhibines, activines, follistatines	68
Figure 22	Évolution des régulations de l'axe reproducteur en fonction du cycle	70
Figure 23	Vie reproductive et vieillissement	74
Figure 24	Structures comparées des récepteurs des œstrogènes	80
Figure 25	Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes	80
Figure 26	Modes d'action et voies de signalisation des œstrogènes	82
Figure 27	La synthèse des stéroïdes dans l'ovaire adulte	84
Figure 28	Le métabolisme des œstrogènes	86
Figure 29	Numérotation des carbones sur la molécule d'œstradiol (E2)	89
Figure 30	Les transporteurs des métabolites des œstrogènes dans les hépatocytes, les entérocytes et le tubule rénal proximal	98
Figure 31	Diagramme de répartition du nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de métabolisation selon leur profil d'expression et l'âge de l'animal	102
Figure 32	Atteintes génotoxiques de l'ADN et mécanismes de réparation	104
Figure 33	Établissement des empreintes épigénétiques chez la souris femelle	108
Figure 34	Le système endocrinien	110
Figure 35	Différentes voies d'absorption des xénobiotiques	114

	MATÉRIEL ET MÉTHODES	Page
Figure 36	Traitement d'une ratte nouveau-née par injection	130
Figure 37	Identification des animaux par tatouage	130
Figure 38	Stratégie expérimentale : traitements et prélèvements	132
Figure 39	Dissection de l'ovaire néonatal	134
Figure 40	Dissection du tractus génital femelle adulte	136
Figure 41	Réaction de polymérisation en chaîne	138
Figure 42	PCR quantitative	140
Figure 43	Dosage LH par ELISA	144
Figure 44	Contrôle de la qualité des ARN - Bioanalyseur	146
Figure 45	Puces à ADN - Microarray	148
Figure 46	Immunohistochimie	156
Figure 47	Synthèse de ribosondes pour HIS	158
Figure 48	Test des comètes	164
	RÉSULTATS	
Figure 49	Stratégie de traitement mise en place afin de caractériser la fenêtre critique de sensibilité ovarienne	174
Figure 50	Impact à 3 jpn d'un traitement à l'E2 10 µg/jour sur le nombre d'ovocytes par ovaire	174
Figure 51	Prolifération cellulaire dans l'ovaire à 3 et 6 jpn	187
Figure 52	Vague de croissance à 3 et 6 jpn	188
Figure 53	Morphologie ovarienne et contexte endocrine à 21 jpn	189
Figure 54	Survenue de la puberté après traitement néonatal à l'E2	190
Figure 55	Santé reproductive de la femelle adulte après traitement néonatal à l'E2	191
Figure 56	Phénotypes ovariens observés à l'âge adulte après traitement néonatal à l'E2	192
Figure 57	Contexte endocrine de la femelle adulte traitée à l'E2 en période néonatale	193
Figure 58	Oviductes issus d'animaux témoins ou traités pendant 3 jours avec de l'E2	194
Figure 59	Utérus issus d'animaux témoins ou traités pendant 3 jours avec de l'E2 10 µg/jr et prélevés à 21 jpn et à l'âge adulte	194
Figure 60	Stratégie de filtration des données et de classification des gènes	208
Figure 61	Profilage du transcriptome ovarien selon la dose d'E2	209
Figure 62	Enrichissements parmi les gènes répondant à l'œstradiol	210
Figure 63	Analyse du réseau d'interactions protéiques entre les produits de gènes répondant à l'œstradiol et leurs partenaires	211
Figure 64	Lésions primaires portées par l'ADN de cellules ovariennes d'animaux nouveaux traités avec de l'E2	212
Figure 65	Réparations de l'ADN dans l'ovaire à 1 jpn	213
Figure 66	Régulation de la mort cellulaire dans l'ovaire à 1 jpn	214
Figure 67	Mort cellulaire via la voie Pi3K	215

Tableaux

	INTRODUCTION	Page
Tableau 1	Caractérisation des premières vagues de croissance folliculaire chez l'animal immature par rapport au recrutement cyclique chez l'adulte	48
Tableau 2	Comparaison des profils hormonaux dans le cadre de la sénescence normale, la sénescence précoce ou le SOPK	76
Tableau 3	Principales familles de Cytochromes P450 chez l'homme, le rat et la souris	88
Tableau 4	Les différentes familles d'UGT chez l'homme, le rat et la souris	90
Tableau 5	Classification des sulfotransférases chez l'homme, le rat et la souris	90

Tableau 6	Les différentes familles de GST chez l'homme, le rat et la souris	92
Tableau 7	Modification des niveaux d'expression de différentes Gst dans l'ovaire et le foie dans trois espèces sous l'influence de trois xénobiotiques	94
Tableau 8	Les transporteurs capables de prendre en charge les œstrogènes	94
Tableau 9	Expression de diverses enzymes du métabolisme des œstrogènes en période périnatale chez l'homme, le rat et la souris	102
Tableau 10	Variation d'expression de Cyp1b1 : 3 espèces, 3 tranches d'âge, 3 organes	106
Tableau 11	Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur la cyclicité et la fertilité chez la ratte et la souris	118
Tableau 12	Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur l'ovaire chez la ratte et la souris	120
Tableau 13	Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur l'hypothalamus et l'hypophyse	124
MATÉRIEL ET MÉTHODES		
Tableau 14	Programmes disponibles sur le Citadel (automate de déshydratation / enrobage)	152
Tableau 15	Programme disponible sur le Varistain (automate de déparaffinage)	152
Tableau 16	Préparation des tampons et solutions utilisés en immunohistochimie	152
Tableau 17	Anticorps utilisés	154
Tableau 18	Couples d'amorces utilisés pour la synthèse de ribosondes d'HIS	156
Tableau 19	Préparation des tampons et solutions utilisés en hybridation <i>in situ</i>	160
Tableau 20	Comparatif des techniques de détection de l'apoptose	162

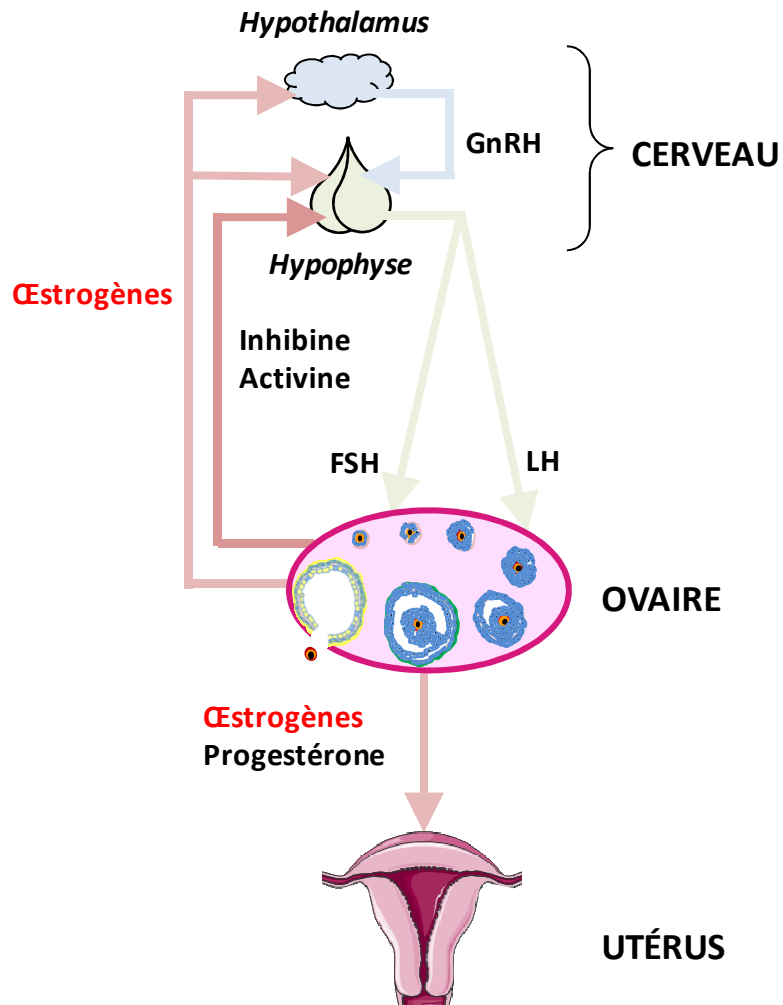


Figure 1 : Schéma simplifié des communications régissant l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) femelle.

La régulation endocrine de la fonction de reproduction implique trois niveaux différents : l'hypothalamus, situé dans le cerveau et produisant la *Gonadotropine Releasing Hormone* (GnRH), l'hypophyse anatomiquement connectée à l'hypothalamus et produisant les gonadotropines *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) et *Luteinising Hormone* (LH) et enfin l'ovaire, situé à distance de l'hypothalamus et de l'hypophyse dans la cavité abdominale. L'ovaire produit les œstrogènes et la progestérone (régulant l'utérus) ainsi que les inhibines et activines et exerce des rétro-contrôles sur les étages supérieurs de l'axe HHG.

Avant-propos

L'ovaire est un organe clé de la reproduction féminine. Il est en effet à l'origine de la production des gamètes : les ovocytes, cellules haploïdes issues de la méiose et destinées à la fécondation après ovulation. La bonne santé reproductive est en partie conditionnée par le bon développement de l'ovaire et de son stock de follicules, lesquels sont les unités fonctionnelles de l'ovaire, contribuant au développement d'un ovocyte. Ce stock de follicules se met en place chez la femme durant la vie fœtale et chez la ratte dans les trois jours suivant la naissance. Ce processus d'histogenèse folliculaire est crucial parce qu'à son terme, le stock de follicules constitué est définitif et sans renouvellement possible (bien que ceci soit sujet à controverse). Les ovocytes, qui ont alors débuté leur méiose sans toutefois l'achever, forment un pool quiescent jusqu'à la puberté. À ce moment-là les follicules commencent à être recrutés de façon cyclique dans le cadre de la vie reproductive. Ce stock est donc déterminant pour les capacités reproductives de l'adulte. S'il est déplété au moment de sa formation, il sera épuisé précocement ou incapable d'assurer ses fonctions, réduisant ainsi les capacités reproductives.

Outre sa fonction gamétique, l'ovaire assure également une fonction endocrine. Il produit les hormones sexuelles féminines et notamment les œstrogènes. La régulation endocrine de la fonction de reproduction (figure 1), très conservée au cours de l'évolution, implique trois organes : l'hypothalamus, l'hypophyse et l'ovaire, formant « l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique » (HHG), en constante communication endocrine. En effet, les hormones ovariennes sont produites en réponse aux signaux hormonaux hypophysaires : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ces deux gonadotropines sont elles-mêmes produites sous le contrôle de la *Gonadotropine Releasing Hormone* (GnRH) hypothalamique mais leur sécrétion peut être modulée grâce à des boucles de rétro-contrôle exercé par les hormones ovariennes (inhibine, activine, œstrogènes et progestérone). Ces dernières sont par ailleurs essentielles pour la régulation des fonctions utérines.

Il est actuellement avancé que les œstrogènes joueraient un rôle dans l'histogenèse folliculaire. En effet, une privation ou un excès d'œstrogènes induisent des troubles de la formation folliculaire. L'importance du contexte endocrine au moment de cette formation folliculaire semble donc établie. Ce contexte endocrine peut être modifié par certains xénobiotiques (molécules non endogènes) d'origines diverses que l'on qualifie de « perturbateurs endocriniens » parce qu'ils ont la capacité d'interférer dans le système hormonal des individus. Dans un contexte de préoccupations croissantes au sujet de l'influence sur notre santé des perturbateurs endocriniens présents dans notre environnement, l'hypothèse de la sensibilité du processus d'histogenèse des follicules aux hormones ou xéno-hormones a conduit à de nombreuses études sur le développement folliculaire sous l'influence de perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique. Nous avons souhaité étudier ce processus en conditions physiologiques ainsi qu'en conditions d'imprégnation œstrogénique excessive puis évaluer les conséquences à plus ou moins long terme sur l'histogenèse folliculaire et le développement ovarien, la puberté et les capacités reproductives.

Introduction

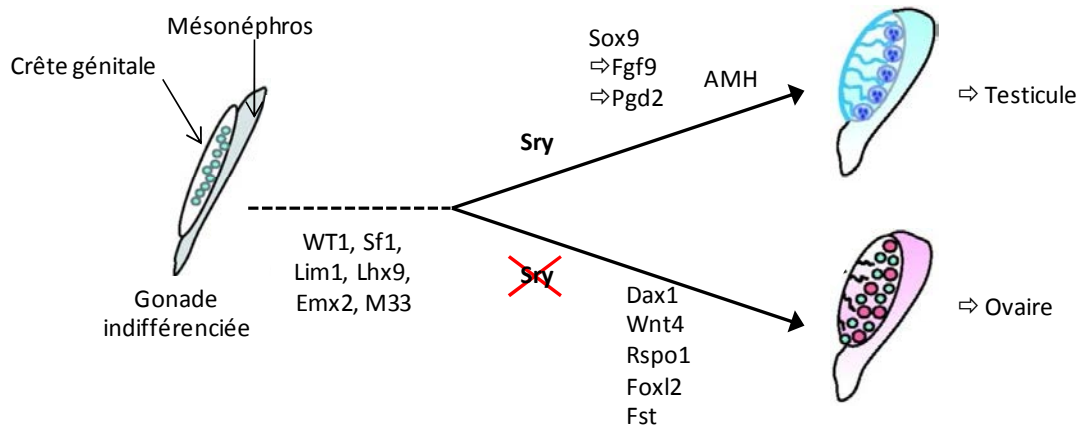


Figure 2 : Contrôle génétique précoce de la différenciation sexuelle.

Après la migration des cellules germinales primordiales aboutissant à la formation de la crête génitale, un pic d'expression du gène *Sry* induit l'expression de *Sox9*, puis de *Fgf9* et *Pgd2* et un peu plus tard de l'AMH pour orienter la différenciation du tractus mâle. En l'absence de ce pic de *Sry*, les gènes *Wnt4*, *Dax1*, *Rspo1* et *Foxl2* sont exprimés, induisant la différenciation de la gonade bipotentielle en ovaire.

D'après Kashimada & Koopman, 2010 ; revue Biason-Lauber, 2010, Loffler & Koopman, 2002

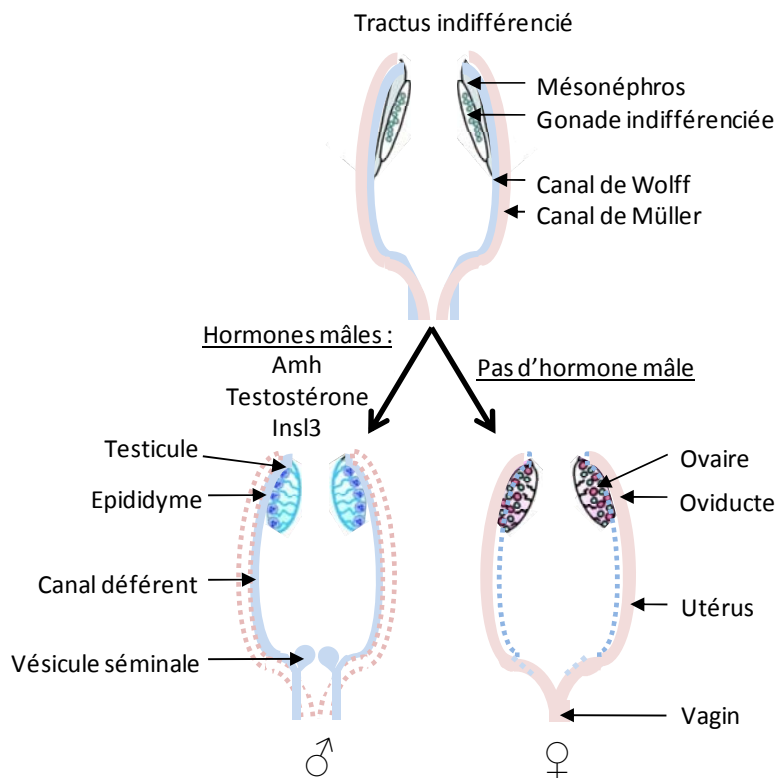


Figure 3 : Différenciation du tractus génital (chez le rongeur)

Le tractus se développe d'abord sous la forme de deux jeux de canaux associés à des ébauches gonadiques indifférenciées. Sous l'influence de la différenciation de cette ébauche gonadique, l'un des jeux de canaux va régresser pour permettre la différenciation de l'autre. L'Amh produite par le testicule fœtal induit la régression des canaux de Müller pendant que la testostérone permet le développement des canaux de Wolff et l'insl3 prépare la descente testiculaire (pour revue, Viger *et al.*, 2005). En l'absence de ces hormones mâles les canaux de Wolff régressent, la gonade reste en place dans l'abdomen et les canaux de Müller expriment différents facteurs permettant leur différenciation (pour revue Masse *et al.*, 2009).

Chez le mâle, les canaux de Wolff sont à l'origine des épидидymes, des canaux déférents et des vésicules séminales. Chez la femelle, les canaux de Müller se différencient en oviductes (ou trompes de Fallope), utérus (unique ou bicorné selon l'espèce) et partie supérieure du vagin.

I. L'ovaire

1. L'OVAIRE EMBRYONNAIRE ET FŒTAL

A. Différenciation précoce de l'ovaire

Au début du développement embryonnaire, et bien que le sexe génétique d'un individu soit déterminé dès la fécondation, le tractus génital est une structure indifférenciée, morphologiquement identique chez le mâle (porteur des chromosomes XY) et la femelle (XX).

Les gonades indifférenciées se forment sur un renflement des mésonéphros (les reins embryonnaires). Ces renflements portent le nom de « crêtes génitales » et sont à l'origine des cellules somatiques de la gonade. La gonade indifférenciée exprime un certain nombre de facteurs essentiels à son propre développement (figure 2). Il a ainsi été démontré que des animaux dont les gènes *Sf1* (NR5a1) ou *Lim1* étaient non fonctionnels présentaient une agénésie gonadique. Les animaux dépourvus de *Wt1*, *Emx2* ou *M33* présentent des malformations du tractus génital ou un retard de développement gonadique (pour revue, Swain & Lovell-Badge, 1999). Il en va de même pour *Lhx9*, qui s'il est défectueux conduit à l'arrêt du développement de la gonade avant sa différenciation (Birk *et al.*, 2000). Cette différenciation se produit vers 11 jours post-conception (jpc) chez la souris et 12 jpc chez le rat sous l'influence du gène *Sry* (Sex determining Region of Y chromosome) (Koopman *et al.*, 1991) alors que les cellules germinales primordiales mâles prolifèrent (Schmahl & Capel, 2003). Ce phénomène représente la clé de la masculinisation phénotypique de l'individu, induisant une cascade d'expression d'autres gènes, tels que *Sox9*, puis *Fgf9* et *Pgd2* et un peu plus tard l'hormone anti-müllérienne (*Amh*). Chez les femelles, en l'absence de l'expression de ces gènes mâles, d'autres gènes (comme *Dax1*, *Wnt4*, *Rspo1*, *Fst* ou *FoxL2*) prennent le relais et induisent le développement d'un ovaire (pour revue, Sarraj & Drummond, 2012). De cette différenciation gonadique découle la différenciation du tractus génital entier (figure 3). En effet, ce tractus se forme de façon indifférenciée par la mise en place de deux jeux de canaux : les canaux de Wolff (les premiers à se mettre en place) et les canaux de Müller. À 10 jpc, les canaux de Wolff sont en place et les canaux de Müller commencent à se développer, guidés par les canaux de Wolff et sous leur contrôle paracrine (sans signal gonadique) (pour revue, Masse *et al.*, 2009). Suite à la mise en place dans l'ébauche gonadique des signaux mâles, les cellules somatiques testiculaires sécrètent des hormones régulant la différenciation du tractus. Ainsi les cellules fœtales de Sertoli produisent l'*Amh* qui va induire la régression des canaux de Müller et les cellules de Leydig produisent la testostérone -induisant la différenciation des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales- et l'insulin-like factor 3 (*Ins13*) responsable de la descente testiculaire trans-abdominale.

Chez la femelle, l'absence de ces signaux mâles provoque la régression des canaux de Wolff mais des gènes *Homeobox* (*Hox*), *Wnt* et β -caténine induisent la différenciation des canaux de Müller, à l'origine des oviductes (ou trompes de Fallope), de l'utérus (cavité unique chez la femme mais sous

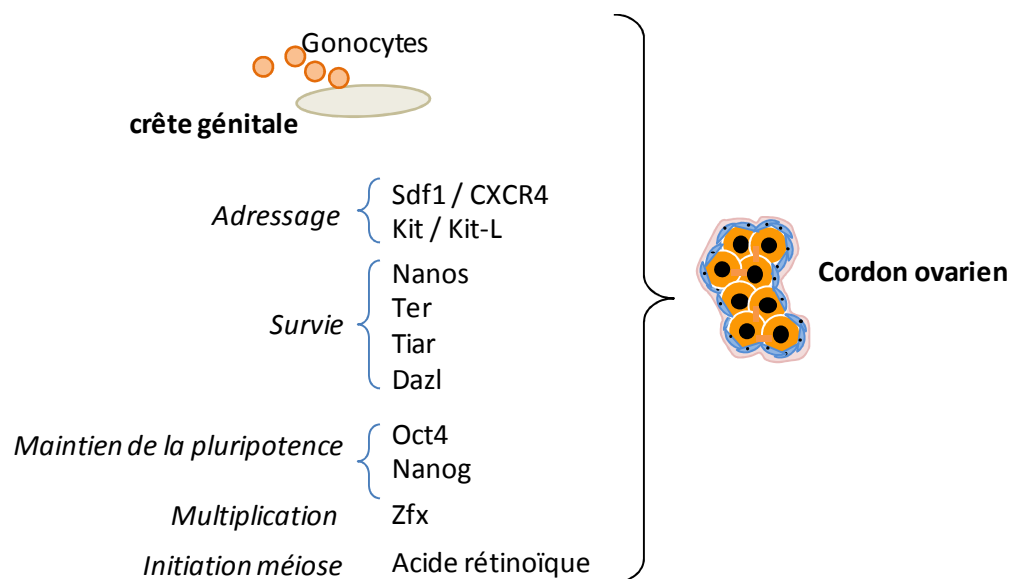


Figure 4 : Facteurs induisant la formation des cordons ovariens.

Les cellules germinales primordiales sont d'origine extra-embryonnaire et leur migration jusqu'à la future gonade nécessite des signaux d'adressage chimiotactique, de survie cellulaire et de maintien de la pluripotence. Lorsque les cellules primordiales sont en place dans la future gonade, elles se multiplient et initient leur méiose grâce à l'acide rétinoïque, signal paracrine délivré par le mésonéphros tout proche.

forme de deux cornes chez les rongeurs) et de la partie supérieure du vagin. La partie inférieure du vagin n'a pas la même origine embryonnaire. L'ovaire, contrairement au testicule, conserve sa place anatomique initiale dans l'abdomen. Cette différenciation phénotypique, qui commence donc *in utero*, se poursuit longtemps après la naissance puisqu'elle ne s'achève qu'à la fin de la puberté et de l'apparition des caractères sexuels secondaires.

B. Les cellules somatiques ovariennes

L'ovaire fœtal contient à la fois les futurs ovocytes et les précurseurs des cellules somatiques. Il s'organise en cordons, structures comprenant les ovocytes en amas et entourées de cellules épithéliales, progénitrices des cellules de la granulosa. Les cordons sont bordés d'une membrane basale en continuité avec l'épithélium de surface ovarien. À l'extérieur de ces cordons se trouvent des cellules mésenchymateuses. Ces cellules progénitrices seraient identiques à celles à l'origine des cellules de Sertoli chez le mâle : chez les individus porteurs du chromosome Y, elles vont exprimer Sry à l'origine de l'engagement de la gonade dans la voie de différenciation mâle (McLaren, 1991). En l'absence de l'expression de ce gène, les cellules s'engagent dans la voie de différenciation femelle et seront à l'origine de cellules de la pré-granulosa (McLaren, 1991). Une autre source de cellules de la granulosa a également été envisagée : le *rete ovarii*, qui s'établit dans la zone de l'ovaire fœtal au contact du mésonéphros, et dont les cellules présentent une grande ressemblance ultrastructurale avec celles de la granulosa de l'ovaire néonatal de souris (Byskov & Lintern-Moore, 1973). Les études de lignage cellulaire grâce à des souris transgéniques exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous la dépendance du promoteur de Sry ont établi que des cellules de la granulosa dériveraient bien des mêmes cellules progénitrices que les cellules de Sertoli mâles (Ito *et al.*, 2006, Albrecht & Eicher, 2001). Toutefois, seule une petite partie des cellules de la granulosa à 2 semaines post-natales exprime la GFP (Ito *et al.*, 2006). Ces cellules progénitrices fournissent en fait les cellules de la granulosa les plus au cœur de l'ovaire (Mork *et al.*, 2012). Les plus externes dérivent de l'épithélium de surface ovarien à un stade de développement plus avancé (Mork *et al.*, 2012). Quant aux cellules de la thèque, qui ne se différencient que plus tard dans l'ovaire post-natal, elles dériveraient de cellules mésenchymateuses du stroma ovarien (Erickson *et al.*, 1985).

C. La cellule germinale dans l'ovaire fœtal

i. *Cellules germinales primordiales – Migration et colonisation*

Entre 10 et 12 jpc chez le rongeur et pendant la cinquième semaine de vie fœtale chez l'homme, des cellules d'origine extra-embryonnaire, les cellules germinales primordiales, migrent pour aller coloniser les crêtes génitales. La formation de ces cellules requiert la présence de Bmp4 (bone morphogenetic protein), sans laquelle cette population de cellules ne peut se former (Lawson *et al.*, 1999). Le nombre de cellules germinales primordiales est toutefois régulé dès cet âge précoce par des facteurs limitants, tels que Bax, facteur pro-apoptotique en l'absence duquel la population de cellules germinales est plus importante (voire trop importante puisque ce nombre est ensuite régulé naturellement par l'ovaire à l'approche de la puberté) (Greenfeld *et al.*, 2007).

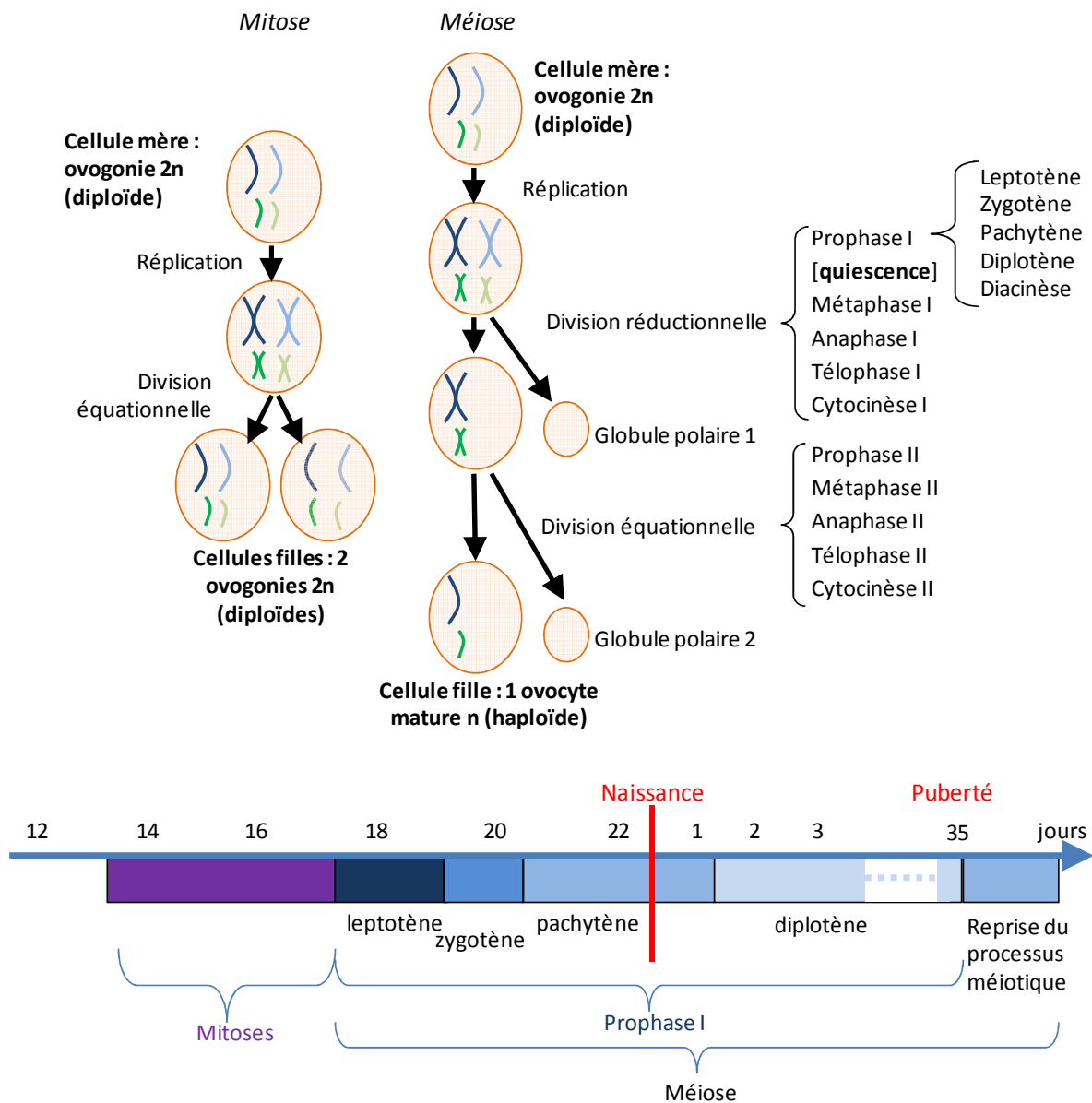


Figure 5 : Les divisions de la cellule germinale chez la ratte

Les cellules germinales subissent d'abord des mitoses entre 13.5 et 17 jours de gestation. Les cellules filles sont diploïdes, comme la cellule-mère. Puis elles entrent en méiose. La méiose se décompose en 2 grandes divisions: réductionnelle (passage de l'état diploïde à l'état haploïde) et équationnelle (passage de 2 à 1 chromatide par chromosome). Chacune de ces divisions est elle-même découpée en phases successives: prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse. La prophase de première division est très longue, elle comprend cinq stades consécutifs. Chez la ratte, les ovogonies sont au stade pachytène au moment de la naissance et en 3 jours elles atteignent le stade diplotène où elles restent en quiescence jusqu'à la reprise de méiose lors du recrutement cyclique des follicules à la puberté. À la fin de la première division de méiose, les deux produits sont inégaux: une cellule haploïde destinée à la poursuite de la méiose et un globule polaire qui dégénère. La deuxième division fournit un seul ovocyte mature haploïde et un second globule polaire.

D'après Beaumont & Mandl, 1962, Rouiller-Fabre *et al.*, 2008

L'étape de migration de ces cellules germinales primordiales est guidée par des signaux de chimio-attraction assurant le bon adressage des cellules (figure 4):

- Sdf 1 (stromal cell derived factor 1 aussi appelée CXCL12) est une chimiokine exprimée par les cellules des crêtes génitales et dont le récepteur CXCR4 est exprimé à la surface des gonocytes (Ara *et al.*, 2003 ; Molyneaux *et al.*, 2003). En l'absence de cette chimiokine, le nombre de cellules germinales dans la gonade est fortement réduit parce que les cellules germinales primordiales n'achèvent pas leur migration jusqu'aux crêtes génitales.
- Le Kit-ligand (présent dans les cellules somatiques) et son récepteur, le kit (exprimé par les cellules germinales primordiales), semblent être la clé du bon adressage des cellules lors de leur migration. En effet, des expériences de chimioattraction ont démontré que le kit-ligand était indispensable à la migration cellulaire (Farini *et al.*, 2007).
- Nanos, Ter, Tiar et Dazl sont quatre facteurs nécessaires à la survie des cellules germinales. Ils ont un effet anti-apoptotique et leur inactivation conduit à une déplétion du stock de cellules germinales. À ce stade précoce du développement ovarien, les cellules germinales primordiales expriment des marqueurs de pluripotence tels qu'Oct4 et Nanog (revue, Monget *et al.*, 2012).

ii. Ovogonies – Mitoses

Au cours de la vie fœtale, les cellules germinales primordiales ovariennes, devenues ovogonies, se divisent par mitoses entre 13.5 et 17.5 jpc chez le rat sous le contrôle de Zfx (Luoh *et al.*, 1997) et sous la stimulation des activines (Martins da Silva *et al.*, 2004). La mitose est une division cellulaire au cours de laquelle une cellule-mère diploïde ($2n = 46$ chez la femme ou 42 chez la ratte) dont les chromosomes ont subi une réplication (et sont donc dotés de 2 chromatides) fournit 2 cellules-filles diploïdes à une seule chromatide. Ce processus permet de conserver la totalité de l'information génétique portée par les chromosomes. La cytokinèse incomplète à la fin de ces mitoses conduit à la formation des « nids ovocytaires », des groupes de cellules germinales liées entre elles par des ponts cytoplasmiques et se divisant de façon synchronisée (Pepling & Spradling, 1998). Ceci forme les cordons ovariens composés par l'amas de cellules germinales entrant en contact avec des cellules épithéliales, les cellules de la pré-granulosa de forme squameuse, qui bordent alors les cordons ovariens. Enfin une membrane basale continue entoure l'intégralité de cette structure (Byskov & Lintern-Moore, 1973; Jeppesen, 1977). À 17.5 jpc, l'acide rétinoïque qui diffuse du mésonephros induit l'expression de Stra8, initiant la méiose (Koubova *et al.*, 2006 ; Baltus *et al.*, 2006 ; Bowles *et al.*, 2006).

iii. Ovocytes – Méiose

La méiose est le processus conduisant à la formation des gamètes haploïdes nécessaires pour la reproduction du futur adulte (figure 5). Contrairement à la mitose, le but n'est pas de conserver la totalité du programme génétique mais seulement la moitié, afin de générer des ovocytes haploïdes capables de fusionner au cours de la fécondation avec un spermatozoïde lui-même haploïde pour reconstituer une cellule diploïde à l'origine du nouvel embryon. La méiose est donc constituée de deux divisions : la première, dite réductionnelle, assure le passage à l'état haploïde et la seconde, équationnelle, ressemble à une mitose. Contrairement à la méiose chez le mâle, une ovogonie diploïde à 2 chromatides ne fournit pas 4 cellules filles haploïdes à 1 chromatide. La première division engendre une cellule fille apte à subir la seconde division et un globule polaire, cellule résiduelle issue de la répartition hétérogène du matériel cytosolique et vouée à la dégénérescence.

Le même phénomène se produit en deuxième division de méiose : un seul ovocyte mature est obtenu, haploïde et contenant suffisamment de matériel cytosolique (notamment les mitochondries et le nucléole, qui sont exclusivement d'origine maternelle). Un second globule polaire contenant le reste du matériel génétique est émis, voué comme le précédent à la dégénérescence. Ces deux divisions (réductionnelle et équationnelle) se déroulent en cinq phases successives :

- Prophase : les fuseaux de division se mettent en place, constitués d'un réseau de microtubules permettant l'acheminement des chromosomes. Le matériel génétique se condense pour faire apparaître les chromosomes et les tétrades - appariement des deux chromosomes à deux chromatides d'une même paire - se forment.
- Métaphase : les chromosomes migrent et s'alignent sur la plaque équatoriale de la cellule.
- Anaphase : les tétrades se séparent et les chromosomes homologues migrent chacun vers un pôle de la cellule.
- Télophase : le fuseau mitotique se dégrade et les chromosomes se relâchent.
- Cytocinèse (ou cytotélerèse): les cytoplasmes se séparent.

La seconde division suit les mêmes étapes. Elle n'est pas précédée d'une étape de réplication de l'ADN et lors de l'anaphase, ce sont les chromatides sœurs qui migrent chacune à un pôle de la cellule.

Lors de la division réductionnelle, la prophase est très longue et elle-même subdivisée en 5 stades (pour revue, De Felici *et al.*, 2005, Schatten *et al.*, 1986). Au stade leptotène, les chromosomes commencent à se condenser et s'apparier. Les tétrades se forment durant le stade zygotène. Au cours du stade pachytène ont lieu des échanges de chromatine entre les différentes chromatides au sein d'une tétrade. La connaissance du processus de recombinaison découle en grande partie des découvertes faites chez la levure. Ces échanges de chromatine résultent de l'induction volontaire de cassures double-brins au sein de l'ADN des chromatides (Sobell, 1975) par la protéine Spo11 (Keeney *et al.*, 1997). Lorsque les brins sont ouverts, des exonucléases viennent digérer les extrémités 3' des brins. Cette activité exonucléasique serait assurée par Com1/Sae2 (McKee & Kleckner, 1997) et un complexe Mre11 / Rad50 / Nbs1 (complexe MRN) (Ivanov *et al.*, 1992; Sharples & Leach, 1995; Connelly & Leach, 1996). Ce complexe MRN fait également office de détecteur des cassures. En quelques minutes, l'histone H2AX est activée par phosphorylation aux abords des sites de cassures (Hunter *et al.*, 2001, Rogakou *et al.*, 1998) et permet le recrutement de la cohésine essentielle à l'établissement des complexes synaptonémaux et à la réparation des cassures (Lowndes & Toh, 2005; Llano *et al.*, 2012). La réparation des « trous » occasionnés utilise alors le principe de complémentarité des bases. En effet, les brins partiellement dégradés sont re-synthétisés en utilisant comme matrice non pas l'homologue naturel mais le brin appartenant à l'autre chromosome de la tétrade. Pour ce faire, les brins doivent s'entrecroiser au niveau des cassures : Rad51 (lui-même recruté par le complexe MRN via la protéine Atm (Ataxia Telangiectasia Mutated, Barlow *et al.*, 1998)) catalyse l'invasion du double brin intact par le simple brin sans homologue après l'action des exonucléases. L'ADN polymérase β est alors chargée de la synthèse des portions d'ADN manquantes (Kidane *et al.*, 2010), à l'aide des complexes Rad51-Rad52-Rad55 et Rdh54-Tidh1-Dmc1 (pour revue, Roeder, 1997). La finalisation des recombinaisons est assurée au sein de structures essentielles aux échanges de chromatine, les nodules de recombinaison, par Msh4, Msh5 et Mlh1. En l'absence de ces nodules, les animaux présentent des défauts de recombinaison (Carpenter, 1979). Les nodules contiendraient des protéines de stabilisation de l'ADN ainsi que des protéines de réparation des

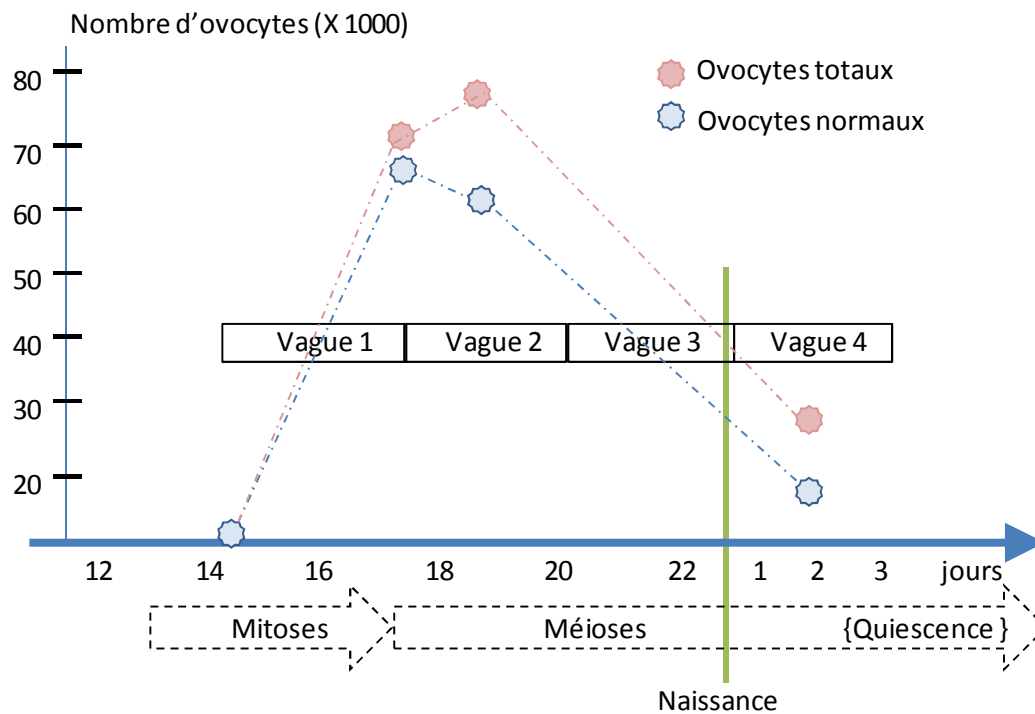


Figure 6 : Évolution du nombre de cellules germinales en période fœtale et néonatale chez la ratte. Les cellules germinales subissent des vagues d'apoptose successives. Le nombre maximal de cellules germinales saines est atteint vers 17 jpc, à la fin de la première vague d'apoptose qui se déroule pendant la phase mitotique. Puis elles entrent en méiose. Les phases de mort cellulaire 2 et 3 se mettent en place *in utero*. La dernière vague a lieu juste après la naissance et coïncide avec la fragmentation des cordons ovariens lors de l'histogenèse folliculaire. D'après Beaumont & Mandl, 1962.

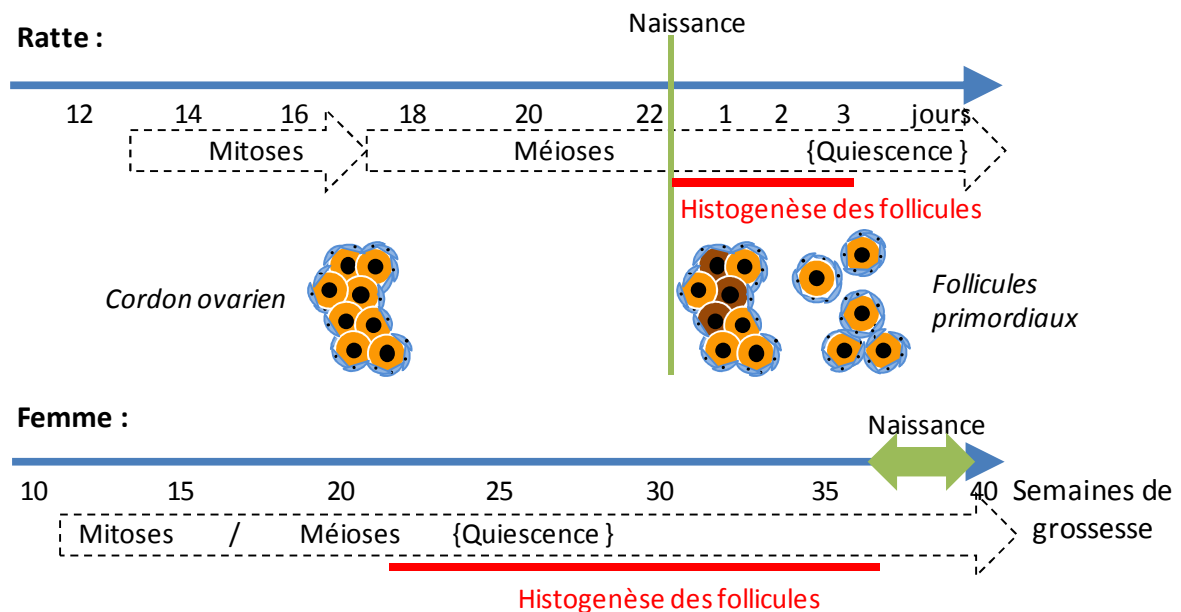


Figure 7 : Chronologie comparée de la fin de morphogénèse ovarienne chez la ratte et la femme. Chez la ratte, les phénomènes de mitoses et méioses se déroulent successivement, alors que chez la femme, ils peuvent se chevaucher. L'histogenèse des follicules a lieu dans les 3 jours suivant la naissance chez la ratte alors que ce même processus a lieu avant la naissance (survenant aux alentours de 39 semaines de grossesse) chez la femme. D'après Sarraj & Drummond, 2012. Le processus d'histogenèse des follicules permet la transition entre les cordons ovariens (amas de cellules germinales -orange- entourés de quelques cellules somatiques -bleues-) et les follicules primordiaux (une cellule germinale unique entourée d'une rangée de cellules somatiques). Les cellules marrons sont les ovocytes apoptotiques.

mésappariements (Plug *et al.*, 1998). En effet, ces bouleversements de l'organisation du matériel génétique nécessitent des vérifications afin de ne pas laisser d'erreurs de recombinaison sur les chromosomes. Un important contrôle a donc lieu à ce stade de la méiose (pachytène). La cellule peut alors choisir de réparer son ADN ou d'entrer en apoptose en cas de dommages trop importants (Pittman *et al.*, 1998). Outre ces bouleversements génétiques, c'est aussi au cours du pachytène que survient la naissance de l'animal. Puis au stade diplotène, les chromosomes se relâchent, les complexes synaptonémaux se désintègrent (pour revue, Roeder, 1997). Ce stade est extrêmement long dans les ovocytes puisque ceux-ci y restent bloqués, quiescents jusqu'à la puberté, où le processus reprend son cours lors de la croissance des follicules. Les chromosomes migrent durant la diacinèse pour préparer la métaphase (voir plus haut). Au contraire de la prophase I, la prophase II est de courte durée.

iv. *Évolution du nombre de cellules germinales pendant la vie fœtale*

Le nombre de cellules germinales est physiologiquement très variable au cours du développement (figure 6). Alors qu'elles se divisent par mitose, elles sont touchées par une première vague de mort cellulaire qui leur est spécifique. Leur ADN s'agrège dans le noyau, formant des grains de pycnose. Toutefois cette vague a un impact limité et le nombre d'ovocytes sains est à son maximum à 17 jpc chez la ratte (Beaumont & Mandl, 1962). La seconde vague, bien plus importante, touche les ovocytes au début de la prophase I (leptotène/ pachytène), provoquant l'apparition de nombreuses cellules germinales atrétiques. La 3^{ème} vague touche les cellules germinales au stade pachytène et se termine donc juste après la naissance. Au cours de ces processus de multiplication / mort cellulaire au sein des cordons ovariens, le nombre d'ovocytes chute de plus de 60 % (Beaumont & Mandl, 1962). Cette mort ovocytaire massive est due notamment à des processus d'apoptose (Coucovanis *et al.*, 1993). La 4^{ème} vague de mort cellulaire physiologique, postnatale, est concomitante avec la fragmentation des cordons ovariens.

2. FORMATION DES FOLLICULES OVARIENS

Les cellules germinales femelles se différencient au cours du temps, subissant divers processus. Alors que chez l'homme, ces différents processus peuvent avoir lieu simultanément, chez les rongeurs le développement se déroule selon des étapes successives (figure 7).

Chez les rongeurs, la formation des follicules (les unités fonctionnelles de l'ovaire) a lieu juste après la naissance à partir des cordons ovariens, ces structures contenant les ovocytes en amas interconnectés par des ponts cytoplasmiques, entourées de quelques cellules épithéliales et d'une membrane basale. Les cellules épithéliales (les pré-granulosa) s'insinuent entre les ovocytes qui sont alors individualisés, enveloppés de cellules épithéliales puis d'une membrane basale, formant les follicules. Enfin, des cellules mésenchymateuses voisines envoient des processus cytoplasmiques entre les follicules nouvellement formés, les séparant tout à fait (Merchant-Larios & Chimal-Monroy, 1989). Ce processus, nommé histogenèse folliculaire, a lieu intégralement *in utero* chez la femme. Elle fait intervenir une vague de mort cellulaire physiologique (la 4^{ème} vague présentée en figure 6) touchant les cellules germinales spécifiquement dans les zones où les nids ovocytaires se fragmentent (Pepling & Spradling, 2001) et où membrane basale subit un remodelage (Rajah & Sundaram, 1994; Mazaud *et al.*, 2005).

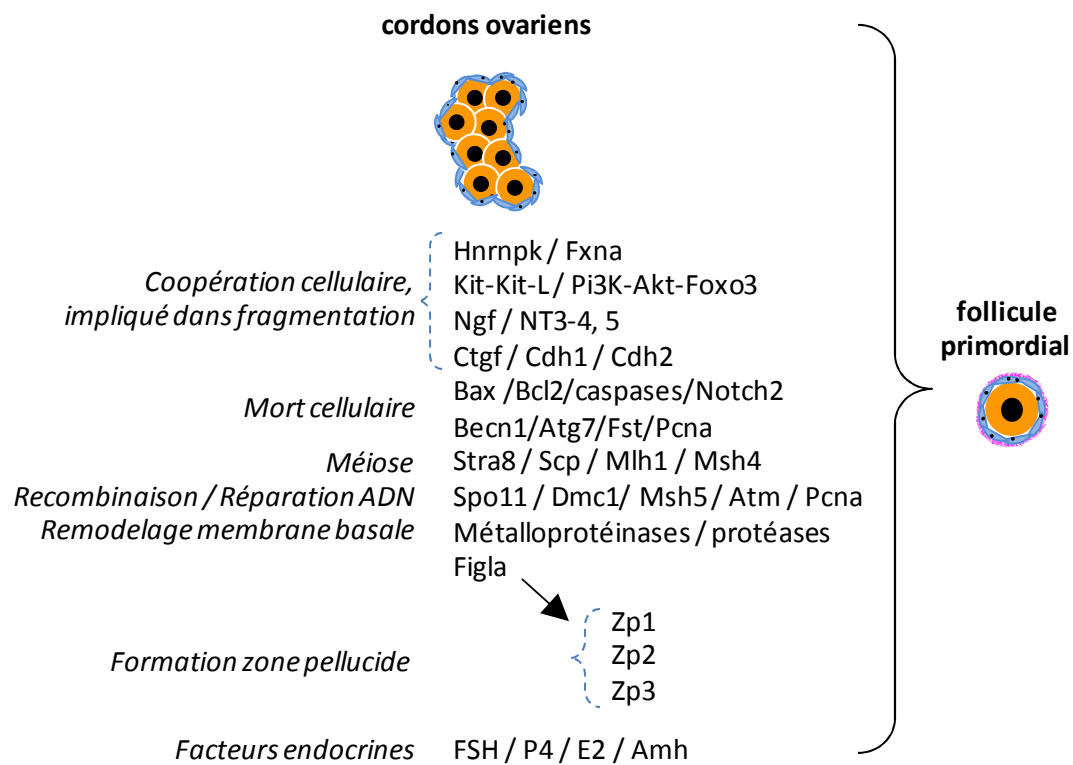


Figure 8 : Facteurs induisant la formation des follicules primordiaux

Cette histogénèse folliculaire suit une dynamique centrifuge : les premiers follicules se forment au cœur de l'ovaire à 0 jour post-natal (jpn) et les derniers en périphérie à 2 jpn (Rajah *et al.*, 1992). Les premiers follicules à se former sont appelés « follicules primordiaux ». Ils sont composés d'une seule cellule germinale entourée d'une assise de cellules somatiques (granulosa) aplaties (Forabosco *et al.*, 1991), assise elle-même bordée par une membrane basale. À la fin du processus de formation des follicules (à 3 jpn chez les rongeurs ou à la naissance chez l'humain), le stock est « fini », il n'y a plus de multiplication des cellules germinales (Zuckerman, 1951; Zhang *et al.*, 2012a). Cet aspect « non renouvelable », bien que nuancé (Johnson *et al.*, 2004), implique que c'est ce stock qui assure par la suite la production des gamètes femelles pendant la totalité de la vie de reproduction et donc conditionne en grande partie la santé reproductive du futur adulte. Il est donc crucial que la mise en place de ce stock se déroule dans de bonnes conditions car si le stock est endommagé, ces dommages sont irréversibles.

A. Processus morphogénétiques

i. *Remodelage de la membrane basale*

La membrane basale est une portion spécialisée de matrice extra-cellulaire. Au moment de l'histogénèse folliculaire, la membrane qui entoure les cordons ovariens (Byskov & Lintern-Moore, 1973) subit un remodelage afin d'individualiser chaque follicule au moment de sa mise en place (Rajah *et al.*, 1992). La dégradation de la membrane existante se déroule en parallèle de la constitution de la nouvelle membrane. Des protéinases d'origine somatique dégradent la membrane dans les zones où la fragmentation des cordons est en cours (Mazaud *et al.*, 2005) démontrant que le remodelage de la membrane est intimement lié au processus de formation des follicules primordiaux. Puis les cellules somatiques produisent de nouveaux composants qui se déposent autour du follicule en cours de formation afin de l'individualiser. La composition de cette membrane et surtout la proportion de chacun de ses constituants varient avec le développement du follicule auquel elle est liée (pour revue, Rodgers & Irving Rodgers, 2002).

La formation des follicules ovariens a lieu sous la dépendance de multiples facteurs (présentés en figure 8) et impliqués dans divers processus auxquels nous allons maintenant nous intéresser.

ii. *Homéostasie ovocytaire*

Nécessité de la présence ovocytaire

Paradoxalement, si la formation des follicules est associée à une forte vague d'apoptose ovocytaire, elle nécessite la présence de ces ovocytes (McLaren, 1991) associées à un nombre approprié de cellules somatiques (Sawyer *et al.*, 2002). Si le nombre d'ovocytes est trop fortement réduit comparativement au nombre de cellules somatiques, il n'y a pas de formation de follicules : chez des rattees irradiées *in utero*, la déplétion du stock d'ovocytes provoque la persistance de cordons ovariens stériles causée par le déséquilibre du ratio cellules germinales / cellules somatiques (Mazaud Guittot *et al.*, 2006).

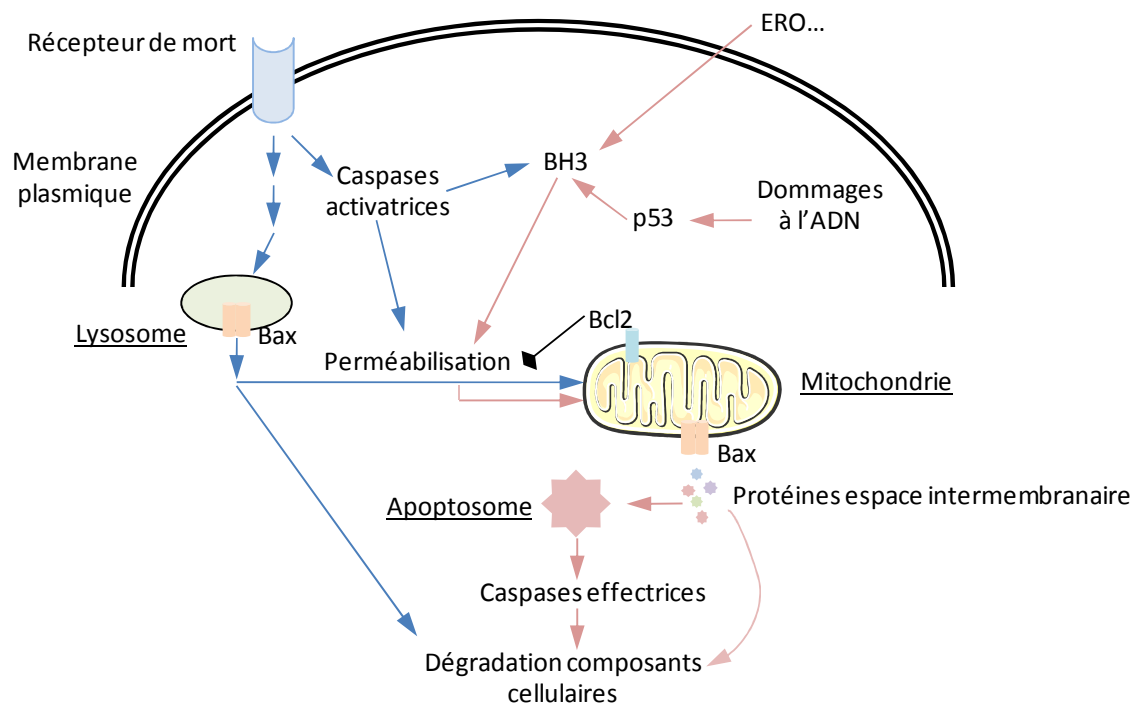


Figure 9 : Schéma simplifié des voies de l'apoptose.

En bleu : voie extrinsèque, en rose : voie intrinsèque.

Les deux voies sont interconnectées. La voie intrinsèque répond à des dommages tels qu'un stress oxydant ou des dommages à l'ADN. Elle induit l'activation de protéines permettant la perméabilisation de la membrane mitochondriale, ce qui entraîne le relargage dans le cytoplasme de protéines de l'espace intermembranaire et l'assemblage de l'apoptosome, régulateurs des caspases effectrices (par exemple la caspase 3) responsables de la dégradation des composants cellulaires. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs de mort. Elle peut rejoindre le déroulement de la voie intrinsèque via la perméabilisation de la membrane mitochondriales ou dégrader plus directement les composants cellulaires via les lysosomes.

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

D'après *Vicencio et al.*, 2008.

Avancement méiotique

Durant la méiose, les chromosomes homologues s'assemblent en tétrades (voir partie I. 1. B iii Ovocytes – Méiose, page 21) au cours du stade leptotène et Spo11 y induit des cassures de l'ADN pour permettre des recombinaisons au niveau des complexes synaptonémaux (dont la mise en place fait intervenir les gènes Scp). Les ovocytes des souris dont le gène codant pour Atm a été invalidé dégénèrent avant la fin du stade pachytène, suggérant que tous les ovocytes ont été éliminés à cause de leur incapacité à réparer les cassures doubles brins induites à ce stade par Spo11 (Barlow *et al.*, 1998). Les animaux déficients en protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ont une formation folliculaire normale si l'induction des cassures de l'ADN est inhibée (Di Giacomo *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'invalidation de Scp1 entraîne un passage précipité au stade diplotène, autorisant alors la formation prématurée des follicules (Paredes *et al.*, 2005). Collectivement, ces données suggèrent que la finalisation de la prophase I de méiose serait un pré-requis nécessaire à la formation des follicules.

Mort ovocytaire

La mort cellulaire programmée des ovocytes implique aussi bien des molécules de voies canoniques de l'apoptose telles que Bax, Bcl2 ou les caspases mais aussi des voies plus spécifiques comme la voie de signalisation Notch. En effet, la déplétion de Notch2 conduit à la persistance de cordons ovariens non fragmentés par réduction de l'apoptose (Xu & Gridley, 2013). La follistatine (Fst) serait également régulatrice de l'apoptose. Des souris dont le gène a été invalidé présentent un nombre d'ovocytes à l'intérieur des nids ovocytaires plus important que les témoins et un taux d'apoptose réduit lors de la fragmentation (Kimura *et al.*, 2011). De même, la réduction de l'expression de PcnA (proliferative cell nuclear antigen) conduit à la formation de follicules primordiaux avec un nombre restreint de cellules somatiques (Xu *et al.*, 2011). Or ce ratio est un garant du développement postérieur correct du follicule.

- Mécanismes : apoptose versus autophagie

La vague de mort ovocytaire néonatale (décrite par Beaumont & Mandl, 1962) est due à des processus d'apoptose et d'autophagie qui peuvent, selon les espèces, toucher différents ovocytes ou co-exister au sein d'un même ovocyte mourant comme c'est le cas chez le rat (Escobar *et al.*, 2008). L'apoptose (figure 9) implique des cascades de réactions conduisant à la dégradation de composants cellulaires sans endommager la membrane plasmique, évitant ainsi la réponse inflammatoire et la propagation du phénomène aux cellules voisines comme c'est le cas dans la nécrose. L'apoptose peut suivre deux voies : « intrinsèque » ou « extrinsèque ». La voie intrinsèque se déclenche en réponse à des dommages tels qu'un stress oxydant ou des lésions de l'ADN. Cette voie, impliquant par exemple la protéine p53 régulatrice du cycle cellulaire, conduit à la perméabilisation des membranes mitochondriales. Ceci provoque le relargage dans le cytoplasme des protéines de l'espace intermembranaire, permettant ainsi l'assemblage de l'apoptosome, un complexe protéique dont le

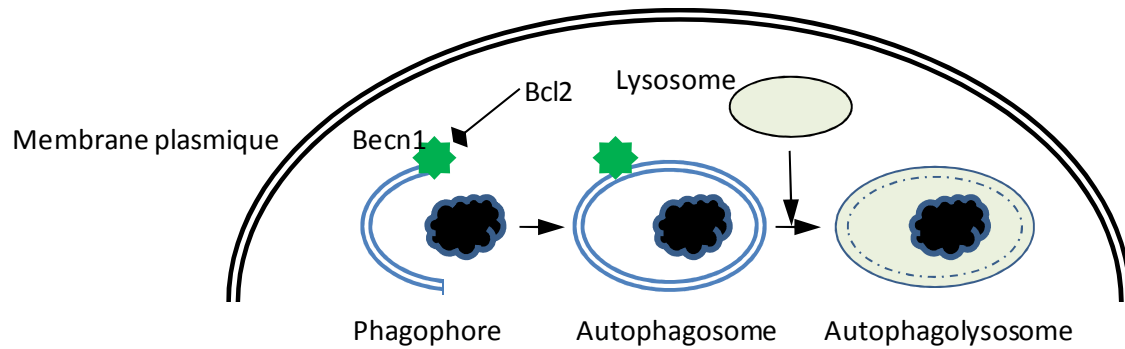


Figure 10 : Schéma simplifié du processus d'autophagie.

Le matériel cytosolique à dégrader (en noir) est piégé dans une structure membranaire, le phagophore, suite à l'activation de voies de signalisation impliquant le facteur Becl1. Cela forme une vésicule à double membrane, l'autophagosome. La membrane externe de celui-ci fusionne avec un lysosome, exposant la membrane interne et son contenu aux hydrolases lysosomales.

D'après Gump & Thorburn, 2011.

rôle activateur s'exerce notamment sur des caspases effectrices capables de dégrader des composants cellulaires. La voie extrinsèque est initiée à la membrane plasmique par l'activation de récepteurs de mort qui peuvent alors recruter des caspases effectrices, induire la perméabilisation des membranes mitochondriales ou activer une cascade de réactions induisant la perméabilisation des membranes des lysosomes. Ceci conduit par protéolyse à la dégradation des composants cellulaires ou encore à la perméabilisation des membranes mitochondriales (pour revue, *Vicencio et al., 2008*).

L'autophagie (figure 10) a trois rôles potentiels dans la cellule : 1) recycler les protéines ou organites endommagés pour « réparer » la cellule et lutter contre une privation de nutriments, 2) dégrader des molécules ou agents infectieux ou 3) induire la mort cellulaire par dégradation d'éléments nécessaires à la survie (pour revue, *Gump & Thorburn, 2011*). Ce processus implique le développement d'un autophagosome (vésicule) englobant les éléments-cibles et induisant leur dégradation par fusion de l'autophagosome avec un lysosome qui libère des enzymes de dégradation (hydrolases). L'autophagie est contrôlée par des cascades de réactions impliquant le facteur Becn1 (Beclin1, très exprimé à 1 jpn) et la voie Pi3K (Phosphatidyl-inositol 3 kinase). L'absence de Becn1 (présentant un rôle central dans le processus) ou d'Atg7 (Autophagy related protein 7, impliquée dans l'extension de l'autophagosome) conduisent à la réduction drastique (plus de 56 %) du nombre d'ovocytes à 1 jpn (*Gawriluk et al., 2011*), impliquant ce processus dans le processus d'homéostasie ovocytaire chez la souris.

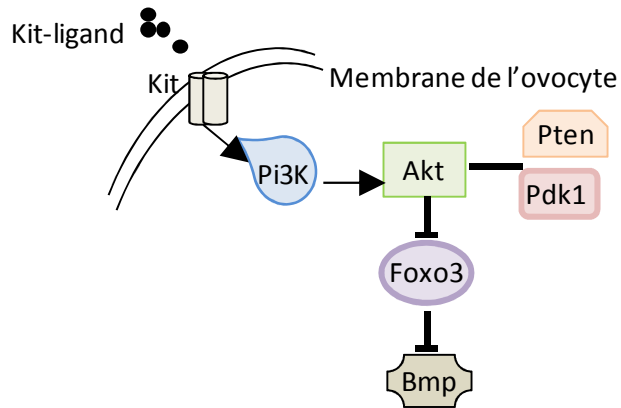
Les processus d'apoptose et d'autophagie sont interconnectés car ils partagent des régulateurs communs. Par exemple, Bcl2 inhibe à la fois l'autophagie et l'apoptose par un mécanisme de liaison respectivement à Becn1 ou Bax. L'absence de Bcl2 chez des souris *Knocked Out* (KO) conduit à la réduction du nombre de follicules primordiaux (*Ratts et al., 1995*). Inversement, la sur-expression de Bcl-2 conduit à l'augmentation du nombre de follicule primordial; cet excès est toutefois naturellement éliminé par l'ovaire avant la puberté (*Flaws et al., 2001*). La caspase 3, caspase effectrice intervenant dans l'apoptose, inhibe l'autophagie au stade terminal de l'apoptose afin de limiter les capacités de réparation de la cellule. p53 module l'autophagie mais est aussi impliqué dans la voie intrinsèque de l'apoptose (pour revue, *Gump & Thorburn, 2011*).

- Finalités

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la perte massive d'ovocytes au cours de la période fœtale et néonatale :

- Les ovocytes éliminés seraient porteurs d'anomalies méiotiques (voir partie I. 1. C iii Ovocytes – Méiose, page 21). Lors de l'appariement des chromosomes et de l'assemblage des complexes synaptonémaux, des erreurs peuvent survenir, provoquant la mort de l'ovocyte (*Burgoyne & Baker, 1984; Speed, 1988*). Des anomalies sur les télomères, conduisant alors à des erreurs de ségrégation, entraînent également l'apoptose de la cellule concernée (*Hemann et al., 2001*) tout comme des mutations sur des gènes gouvernant l'appariement chromosomique et la formation des complexes synaptonémaux (*Msh4, Kneitz et al., 2000, Dmc1 Pittman et al., 1998*) et des gènes de réparation de l'ADN (*Mlh1, Edelmann et al., 1996*). L'ovaire ne conserverait ainsi que les ovocytes de bonne qualité.

A



B

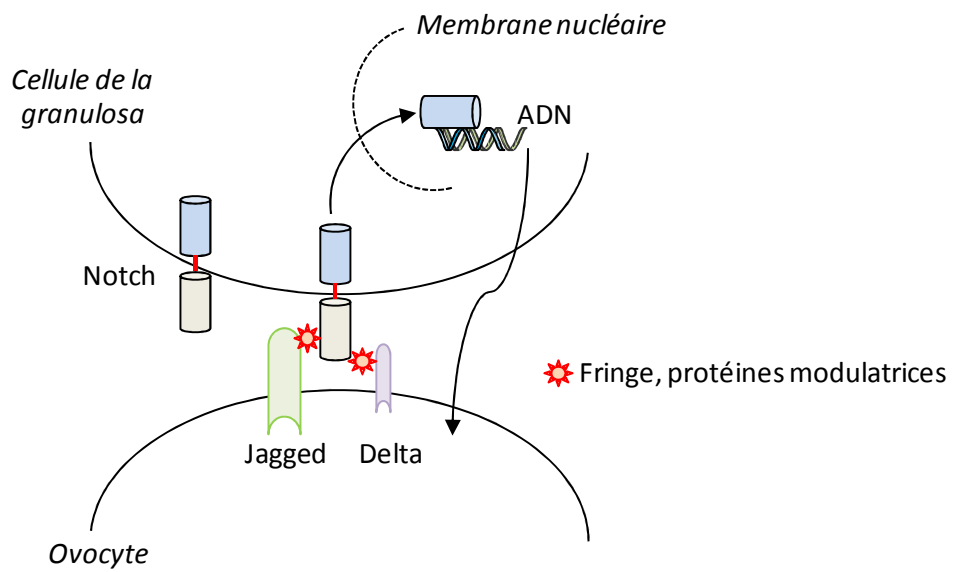


Figure 11 : Voies de signalisation cellulaire :

A) Kit/Kit-ligand et Pi3K/Akt

B) Notch.

Ces voies sont au cœur de la communication entre les cellules germinales et somatiques.

D'après Dumortier *et al.*, 2005, Trombly *et al.*, 2009.

- Les ovocytes éliminés auraient un déficit en facteurs de survie. Par exemple, Scf (kit-ligand) et Lif produits par les ovocytes sont anti-apoptotiques (Pesce *et al.*, 1993). L'acide rétinoïque, initiateur de la méiose, est également un facteur de survie ovocytaire (Koshimizu *et al.*, 1995).
- Le ratio cellules de la granulosa (nourricières) / cellules germinales serait aussi déterminant et en l'absence d'un nombre satisfaisant de cellules somatiques, l'ovocyte serait incapable de se développer (Sawyer *et al.*, 2002).
- Les ovocytes éliminés se « sacrifieraient » pour améliorer la qualité de ceux appelés à survivre. De la même façon que le globule polaire lors de la méiose cède ses organites à la cellule germinale fonctionnelle, les ovocytes, qui communiquent par des ponts cytoplasmiques établis lors de la cytokinèse incomplète pendant la mitose, échangeraient du matériel cytoplasmique afin de garantir le meilleur équipement aux ovocytes participant à la formation des follicules primordiaux. C'est notamment le cas des mitochondries dont la migration à travers les ponts cytoplasmiques a été décrite juste avant la fragmentation des nids ovocytaires (Pepling & Spradling, 2001).

B. Dialogue entre cellules somatiques et germinales : régulation paracrine de la formation folliculaire

i. *Kit ligand / c-kit et voie Pi3K / Akt*

Ces voies de signalisation cellulaires interviennent dans tous les tissus dans de nombreux processus. Dans l'ovaire spécifiquement elles jouent un rôle majeur dans la formation des cordons ovariens, l'établissement du pool de follicules primordiaux et plus tard dans leur recrutement. L'implication de Kit / kit-ligand a déjà été mentionnée dans le phénomène de migration et colonisation des crêtes génitales par les cellules germinales primordiales. Lors de la formation des follicules primordiaux, l'Akt (serine-threonine protein kinase) est activée par un produit de Pi3K (phosphatidylinositol-3-phosphate kinase) répondant à des signaux externes tels que l'interaction entre Kit (présent dans les ovocytes) et son ligand (présent dans les cellules de la granulosa) (figure 11 A). Chez l'adulte, l'importance de cette voie de signalisation a été démontrée dans l'ovaire suite au constat de l'arrêt prématuré du développement des follicules avant le stade antral chez des souris portant une mutation empêchant la fixation entre kit et Pi3K (Kissel *et al.*, 2000). Chez la ratte néonatale, la mise en culture organotypique d'ovaires en présence de kit-ligand entraîne l'augmentation de l'activation de Foxo3a par phosphorylation et la réduction de l'apoptose qui frappe l'ovaire néonatal (Liu *et al.*, 2009). Le lien entre Foxo3a et apoptose a par ailleurs été confirmé par la démonstration de la corrélation positive spatiale et temporelle entre les marquages de l'ADN endommagé au cours de l'apoptose (TUNEL) et de Foxo3a dans le noyau d'ovocytes de ratte à la naissance (Sui *et al.*, 2010). L'action promotrice de cette voie de signalisation sur la formation des follicules primordiaux a aussi été démontrée chez le hamster (Wang & Roy, 2004).

ii. *Système Notch*

La voie de signalisation Notch est impliquée dans de nombreux processus biologiques et pathologies. Notch (figure 11 B) possède 2 types de ligands : les Jagged et les Delta, qui se fixent sur la partie

extracellulaire de Notch. Un clivage se produit alors par l'intermédiaire de métalloprotéase et sécrétase et la partie intracellulaire passe dans le noyau afin d'activer la transcription de ses gènes cibles. La signalisation par Notch est modulable par des protéines de la famille Fringe. Dans l'ovaire néonatal de souris, Jagged est exprimé par les cellules germinales et Notch par les cellules somatiques. Si les ovaires mis en culture à la naissance sont traités avec un inhibiteur de sécrétase (enzyme de clivage atténuant la voie de signalisation), la proportion de follicules primordiaux formés après 4 jours est réduite tandis que la proportion de follicules encore inclus dans des nids ovocytaires est augmentée (Trombly *et al.*, 2009). Chez des souris dont le gène Notch2 a été invalidé spécifiquement dans les cellules de la granulosa, la fragmentation des nids ovocytaires est perturbée, induisant la formation de MOF mais réduisant le nombre de follicules primordiaux formés (Xu & Gridley, 2013). L'apoptose est elle aussi réduite. De plus, les souris KO pour le gène codant pour la protéine Lunatic Fringe (ce qui a pour effet d'inhiber la signalisation Notch) présentent des défauts de méiose (Hahn *et al.*, 2005). Ceci démontre d'une part l'importance de la voie de signalisation Notch dans la formation des follicules et d'autre part la grande coopération établie entre les cellules somatiques et germinales. Les cellules de la granulosa régulent le destin des ovocytes via cette voie de signalisation.

iii. *Neurotropines*

Les Ngf (Nerve Growth Factor) sont également impliqués dans l'assemblage des follicules primordiaux, par un mécanisme mal connu (Kerr *et al.*, 2009). Les autres neurotropines Bdnf (brain derived neurotropic factor), Nt3 et Nt 4-5 sont également impliquées. Elles sont majoritairement exprimées par les cellules somatiques mais leurs récepteurs sont portés par les cellules germinales (pour revue, Dissen *et al.*, 2009). Les souris KO pour le gène codant pour le TrkB (récepteur du NGF) présentent à 4 jpn un nombre de cellules germinales très réduit (plus de 50 % de perte par rapport au contrôle) et seulement quelques follicules (Spears *et al.*, 2003). De plus il semble exister un lien entre les neurotropines et la voie de signalisation Notch dans l'ovaire, expliquant la réduction du nombre d'ovocytes chez les souris KO TrkB (Dorfman *et al.*, 2011). Les neurotropines seraient donc impliquées dans la survie des cellules germinales via la coordination entre les cellules somatiques et les germinales.

iv. *Facteurs de croissance de la famille du TGFβ*

- AMH

L'Amh, dont l'expression fœtale chez le mâle induit, avec la testostérone, la masculinisation du tractus génital (pour rappel, figure 2), est également une hormone exprimée chez la femelle. Chez la ratte, elle n'est toutefois exprimée qu'après la naissance par les cellules de la granulosa à partir du stade « follicule primaire » (Hirobe *et al.*, 1992) et son expression augmente chez le rat entre le jour de la naissance et le jour 4 (Kezele *et al.*, 2005b). Ses récepteurs sont quant à eux exprimés dans l'ovaire dès la naissance (Durlinger *et al.*, 2002). Cette hormone est considérée comme un facteur de quiescence ovocytaire, inhibant la fragmentation des nids ovocytaires (Nilsson *et al.*, 2011b).

- Inhibines / activines

La balance inhibine / activine a également été proposée comme régulateur de la formation des follicules primordiaux. Les activines sont très exprimées chez la souris au moment de la formation des follicules primordiaux, dans les cellules germinales et somatiques. Leurs récepteurs γ sont également présents (Bristol-Gould *et al.*, 2006). Un traitement à l'activine au moment de la formation de ces follicules en augmente le nombre. Toutefois cette augmentation n'est pas persistante et lors de la puberté, le nombre de follicules est similaire chez les animaux traités et les témoins (Bristol-Gould *et al.*, 2006). Bien que la présence d'inhibine n'ait été rapportée dans l'ovaire de souris qu'à partir de 3 jpn (Drummond *et al.*, 2000), la formation des follicules primordiaux des souris chez qui le gène de l'inhibine α a été invalidé semble avoir lieu normalement mais des troubles du recrutement folliculaire interviennent très rapidement (avant 12 jpn) (Myers *et al.*, 2009). L'histogénèse folliculaire des souris exprimant moins de follistatine est également perturbée : le nombre de cellules germinales est plus important, l'apoptose est réduite et le processus de formation des follicules se poursuit au-delà de 3 jpn (contrairement aux animaux témoins) soulignant l'importance des follistatines dans la régulation du nombre de cellules germinales en période périnatale (Kimura *et al.*, 2011).

v. *Facteurs de transcription*

De multiples facteurs, tels que Hnrnpk, sont régulateurs de nombreuses protéines impliquées notamment dans le cycle cellulaire et leur absence réduit la formation des follicules primordiaux (Wang *et al.*, 2011). Fxna, dont la délétion conduit également à la persistance de cordons ovariens non fragmentés sans dérégulation de l'apoptose ou défaut de prolifération des cellules de la granulosa, est nécessaire pour coordonner l'organisation des cellules en follicules primordiaux (Garcia-Rudaz *et al.*, 2007). Figla (*factor in the germline*) est connu pour réguler l'expression des gènes Zp à l'origine de la mise en place de la zone pellucide (portion de la matrice extracellulaire apparaissant au stade primaire du développement folliculaire) et sa délétion empêche la formation des follicules primordiaux (Soyal *et al.*, 2000). Nobox est également impliqué dans la formation folliculaire. En son absence, les follicules sont beaucoup plus lents à s'assembler. Toutefois, Nobox est essentiel pour la suite du développement folliculaire (Rajkovic *et al.*, 2004).

vi. *Facteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire*

Dans l'ovaire de hamster, l'expression de deux molécules d'adhésion cellulaire a été étudiée en période périnatale (Wang & Roy, 2010). Cdh1 (codant pour la E-cadhérine) est exprimé dans les ovocytes quel que soit le stade de développement folliculaire. Cdh2 (N-cadhérine) s'exprime dans les ovocytes pendant la vie fœtale et avant la formation des follicules. Quand les follicules se forment, son expression faiblit dans les cellules germinales et apparaît dans les cellules de la granulosa. Pendant la croissance folliculaire, seules les cellules de la granulosa l'expriment. L'expression de ces deux molécules d'adhésion se modifie précisément au moment de la formation des follicules primordiaux, suggérant leur implication dans le bon déroulement de ce processus (Wang & Roy, 2010).

Le Ctgf (connective tissue growth factor) est également connu pour son implication dans l'adhésion cellulaire, le remodelage tissulaire et la formation de la matrice extra-cellulaire. Après que l'expression de cette molécule ait été identifiée comme étant très modifiée précisément au moment de la formation des follicules (Kezele *et al.*, 2005b), son rôle dans ce processus a été évalué à l'aide d'un modèle d'ovaire de ratte mis en culture à la naissance. L'adjonction de Ctgf dans le milieu conduit à l'augmentation du nombre de follicules formés à 2 jpn, suggérant là encore la possible implication de cette molécule dans le processus d'histogenèse folliculaire (Schindler *et al.*, 2010).

C. Théorie du contrôle endocrine de la formation folliculaire

i. FSH

L'influence de la FSH est controversée. Lei *et al.* ont observé l'augmentation physiologique du taux sérique de FSH chez la souris au moment de la formation folliculaire (Lei *et al.*, 2010). À cette période, les récepteurs de la FSH sont exprimés dans l'ovaire de souris (bien qu'en faible quantité) par les cellules de la granulosa (O'Shaughnessy *et al.*, 1997). Toutefois, l'injection d'un extrait d'hormone équine (PMSG, analogue de la FSH) à de jeunes souris n'a révélé aucun effet de cette hormone sur les follicules (Peters *et al.*, 1973). Cependant, le traitement a été effectué entre 3 et 6 jpn, soit trop tardivement pour mesurer son impact sur la formation des follicules. Roy & Albee ont traité des femelles hamster gestantes à l'aide d'anticorps anti-FSH afin d'observer le devenir néonatal des ovaires des femelles issues de ces gestations (Roy & Albee, 2000). Les anticorps anti-FSH réduisent le nombre de follicules primordiaux formés mais cet effet est presque intégralement inversé par une injection de PMSG le jour de la naissance, démontrant l'importance de cette hormone dans le processus de formation folliculaire.

Chez la femme, une déficience congénitale de la FSH n'entraîne pas de perturbation de l'histogenèse folliculaire. L'étude de Matthews rapporte que la stimulation par de la FSH exogène induit une ovulation efficace (Matthews *et al.*, 1993). Les souris KO pour le gène de la FSH sont infertiles à cause de l'arrêt de la folliculogenèse mais ce blocage ne survient qu'à un stade de développement du follicule bien postérieur à la formation des follicules primordiaux. Là aussi, un apport de FSH exogène permet de restaurer la fertilité (Kumar *et al.*, 1997). Les souris KO pour le récepteur de la FSH présentent le même phénotype ovarien : absence de follicules au-delà du stade « petit antral » et infertilité (Dierich *et al.*, 1998). Toutefois, en l'absence d'étude de la mise en place des follicules primordiaux sur ces modèles KO, on ne peut affirmer que ce processus se déroule intégralement normalement.

ii. Progestérone

La progestérone est une hormone sécrétée majoritairement chez l'animal mature par le corps jaune, structure folliculaire résiduelle issue de l'ovulation. Elle ralentit la formation des follicules primordiaux mais aussi la transition « primo/primaire » chez le rat, le veau ou la souris (Kezele & Skinner, 2003; Nilsson & Skinner, 2009; Guo *et al.*, 2012). Le maintien du taux de progestérone à son maximum (atteint vers le milieu de la gestation) entraîne chez la souris la diminution de l'expression de facteurs impliqués dans la fragmentation des cordons, notamment Notch (Guo *et al.*, 2012). Cependant la réceptivité de l'ovaire néonatal pour la progestérone est inconnue et les ovaires des

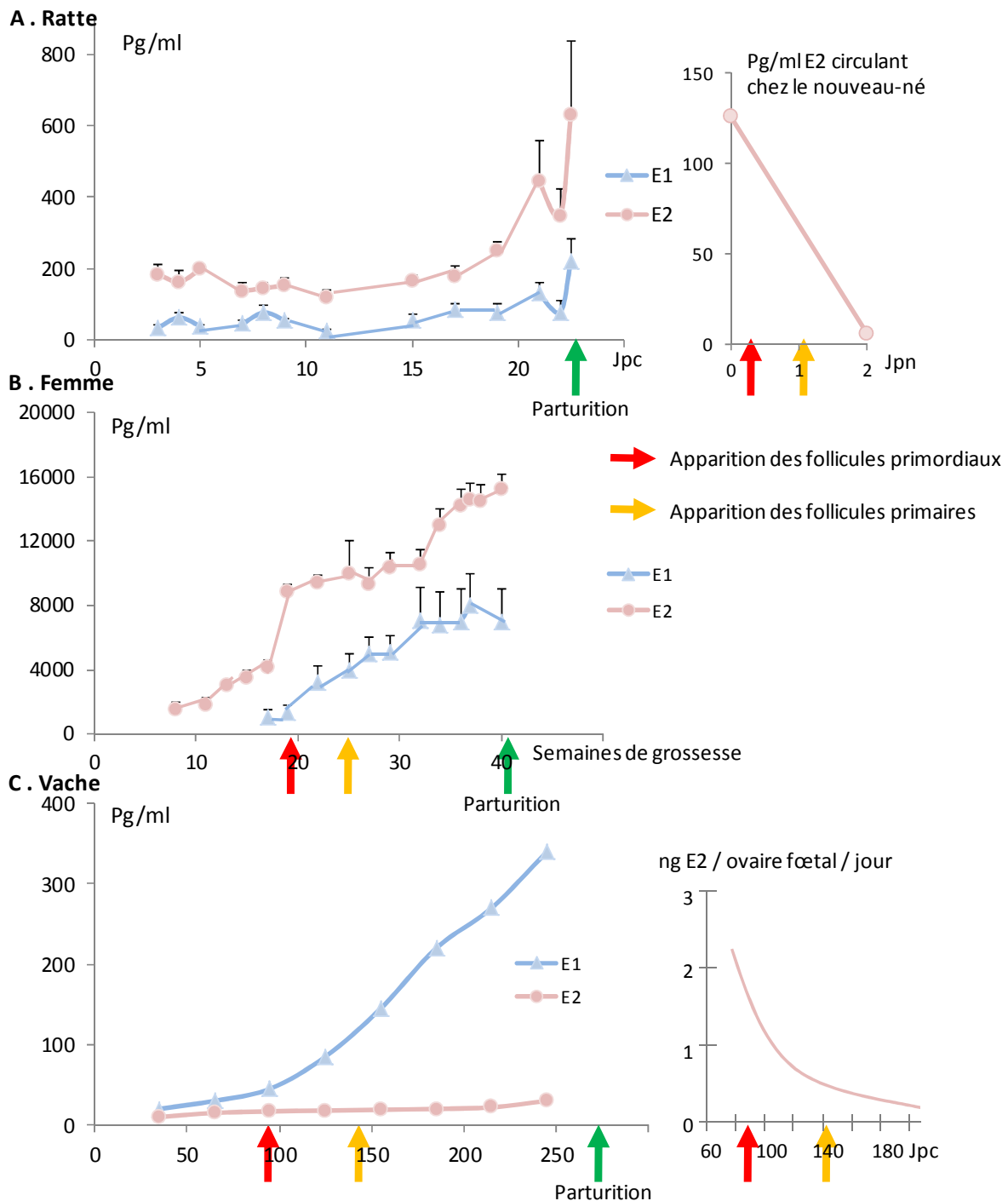


Figure 12 : Taux maternels circulants de 2 œstrogènes (œstradiol E2 et œstrone E1) au cours de la gestation chez la ratte \pm SE (A), chez la femme \pm SEM (B) et chez la vache (C) D'après les données brutes de Shaikh, 1971, Levitz & Young, 1977, Fortune *et al.*, 2011, Montano *et al.*, 1995.

Chez la vache, les taux sont variables suivant les études (Pape-Zambito *et al.*, 2008, Kohan-Ghadr *et al.*, 2011, Patel *et al.*, 1995) mais les profils suivent la même évolution avec une augmentation des œstrogènes, surtout sous forme d'œstrone au cours de la gestation.

Chez le rat, la formation des follicules a lieu dans un contexte de décroissance de la concentration en œstrogènes alors que chez la femme et la vache, cette formation a lieu pendant l'augmentation de cette concentration. Toutefois, l'ovaire bovin fœtal produit lui-même des œstrogènes et au moment de la transition primo/primaire, cette concentration diminue de façon drastique, tout comme chez la ratte lors de la levée de l'imprégnation maternelle.

souris KO pour le gène du récepteur de la progestérone semblent se développer normalement, présentant à l'âge adulte des follicules jusqu'au stade antral (Fernandez-Valdivia *et al.*, 2010).

iii. Œstrogènes / œstradiol

L'élucidation du mécanisme d'action de ces hormones dans le cadre de la formation folliculaire a fait l'objet de nombreuses études utilisant différentes approches méthodologiques.

- Profils hormonaux

Le contexte endocrine, et en particulier les taux circulants d'œstrogènes, sont fondamentalement différents au moment de la formation folliculaire selon l'espèce considérée (figure 12). Comme mentionné précédemment, la formation des follicules a lieu après la naissance chez les rongeurs mais *in utero* chez la femme ou chez les ruminants. Chez le rat, les taux d'œstrogènes maternels augmentent au long de la gestation, avec une prédominance de l'œstradiol. Les follicules primordiaux et primaires se forment lorsque ce taux s'effondre, après la naissance (Montano *et al.*, 1995). Chez la femme, les taux d'œstrogènes augmentent fortement au cours de la grossesse, avec également une prédominance de l'œstradiol. Les follicules se forment donc pendant l'augmentation de ces taux. Chez la vache, comme chez la femme, le taux d'œstrogènes augmente aussi durant la gestation mais avec une prédominance de l'œstrone. Les follicules se forment ainsi pendant une phase d'augmentation des taux d'œstrogènes maternels circulants. Mais les ovaires fœtaux ont une production locale d'œstradiol et le taux de follicules primaires est inversement corrélé au taux d'œstrogènes naturellement produits par le fœtus autour de la période de formation des follicules (Yang & Fortune, 2008). Un phénomène similaire se déroule chez la brebis (Juengel *et al.*, 2002). Les œstrogènes ont donc un rôle dans le développement folliculaire précoce en ralentissant l'activation des follicules primordiaux en follicules primaires chez beaucoup d'espèces, en cas de formation folliculaire *in utero* (brebis, vache, femme...) comme post-natale (ratte, souris...).

- Réceptivité ovarienne

La réceptivité de l'ovaire aux œstrogènes au moment de la formation des follicules dans plusieurs espèces est présentée dans le tableau suivant :

	ER α		ER β		Références
	Cell. somatiques	Cell. germinales	Cell. somatiques	Cell. germinales	
Humain	+	++	+	++	Fowler <i>et al.</i> , 2011
Babouin	+	-	++	++	Pepe <i>et al.</i> , 2002
Vache	++	-	-	++	Garverick <i>et al.</i> , 2010
Rat	+	-	+	-	Sar & Welsch, 1999; Mowa & Iwanaga, 2000
Souris	+		++		Jefferson <i>et al.</i> , 2000

Chez la souris, les données ont été obtenues par PCR sur des ADNc issus d'ARN d'ovaires totaux et ne fournissent donc pas d'indication sur la localisation des récepteurs. Cell. = cellule.

Toutes les espèces concernées expriment ces récepteurs des œstrogènes. Il n'y a en revanche que peu d'informations sur l'expression de Gper à cette période. La présence de ce récepteur a seulement été rapportée dans les cellules somatiques de l'ovaire de hamster (Wang *et al.*, 2008b).

- Théorie hormonale

En 2003, Kezele & Skinner observent que les ovaires de ratte cultivés *in vitro* effectuent leur transition « primo/primaire » plus rapidement que les ovaires *in vivo* mais que cet effet est annulé par l'ajout de progestérone ou d'œstradiol dans le milieu de culture. Ils émettent alors l'hypothèse que ces phénomènes sont régulés par les hormones maternelles *in utero* et que la fragmentation des cordons ovariens et la transition « primo/primaire » s'initient à la naissance de l'animal, quand il passe d'un milieu riche en hormones maternelles à un environnement sans hormone (l'animal étant trop jeune pour en synthétiser lui-même) (Kezele & Skinner, 2003). La naissance s'apparenterait donc à une levée de l'imprégnation hormonale maternelle. Chen *et al.* observent également que les œstrogènes et la progestérone inhibent la fragmentation des nids ovocytaires à la fois *in vivo* et *in vitro* mais que cette fragmentation peut être initiée dans des ovaires fœtaux mis en culture, mimant ainsi la levée de l'imprégnation hormonale maternelle liée à la naissance (Chen *et al.*, 2007b). Lei *et al.* observent que chez la souris, le taux d'œstrogène décroît pendant que celui de FSH augmente entre 0 et 3 jours post-natals, permettant l'expression de facteurs impliqués dans la formation des follicules primordiaux, notamment Figla et Nobox (pour rappel, voir figure 8). Or ça n'est pas le cas si des ovaires de même âge sont maintenus en culture dans un milieu contenant une concentration en œstrogènes reflétant la concentration *in utero* (Lei *et al.*, 2010). Toutes ces observations ont conduit à la suspicion d'un rôle important des œstrogènes dans la formation des follicules. Ce rôle a été exploré à de nombreuses reprises en utilisant plusieurs stratégies expérimentales : la privation d'œstrogènes ou la surexposition à des œstrogènes.

- Surexposition aux œstrogènes

Les Follicules Multi-Ovocytaires (MOF) sont des follicules qui au lieu de contenir une cellule germinale unique contiennent (au moins) deux ovocytes. Leur présence physiologique à l'âge adulte est plus ou moins courante selon l'espèce. Ils sont par exemple fréquents dans l'espèce humaine ou chez le chien, où ils sont non seulement nombreux mais fonctionnels, capables d'être fécondés et de permettre le développement d'embryons (pour revue, Reynaud *et al.*, 2010). En revanche, ces MOF sont très rares chez le rat et la souris. Ils peuvent se former lors de la fragmentation incomplète des cordons ovariens (Jefferson *et al.*, 2006) résultant alors d'un dysfonctionnement lors de la formation des follicules primordiaux. Toutefois ce sont généralement des structures dysfonctionnelles transitoires, naturellement et rapidement éliminées par l'organe avant la puberté (Losa *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2010). D'autres études ont également rapporté la présence de ces MOF chez la souris ou le rat après un traitement néonatal (c'est-à-dire pendant la période normale de formation des follicules) par des œstrogènes (Iguchi *et al.*, 1986; Kipp *et al.*, 2007; Losa *et al.*, 2011) démontrant

ainsi la sensibilité de l'histogenèse folliculaire à cette hormone. Chez des souris traitées avec des œstrogènes, les ovocytes restent alors interconnectés via les ponts cytoplasmiques bien après la période normale de formation des follicules primordiaux (Jefferson *et al.*, 2006). La testostérone induit également la formation de MOF chez la souris (Iguchi *et al.*, 1986) mais cet effet pourrait être dû à la sur-conversion de ces androgènes en œstrogènes. Les effets sont les mêmes qu'avec une exposition directe aux œstrogènes et sont annulés par un traitement avec un inhibiteur de l'enzyme responsable de la conversion (Iguchi *et al.*, 1988). Toutefois, un faible taux d'œstrogènes peut avoir un effet « protecteur » sur le stock de follicules en augmentant la survie ovocytaire et le nombre de follicules primordiaux formés. Ces effets sont inhibés par l'ajout d'un antagoniste des récepteurs des œstrogènes et au-delà d'une certaine dose, l'œstradiol (E2) augmente l'apoptose chez le hamster (Wang & Roy, 2007).

- Privation d'estrogènes

Par inhibition d'enzyme de conversion :

Chez le babouin, la formation des follicules primordiaux a lieu *in utero* (comme chez la femme). Elle se déroule entre 100 et 165 jours de gestation. Un traitement par un inhibiteur d'aromatase, enzyme transformant les androgènes en œstrogènes et réduisant de plus de 95 % le taux d'œstrogènes circulants, induit une diminution du nombre de follicules primordiaux (Zachos *et al.*, 2003), une fragmentation des cordons ovariens incomplète et une diminution du nombre d'ovocytes intacts (Albrecht & Pepe, 2010). En l'absence de récepteurs d'androgènes sur l'ovaire à cet âge, les résultats obtenus ne peuvent être dus qu'à l'absence d'œstrogènes et non pas à l'augmentation du taux d'androgènes (Albrecht & Pepe, 2010).

Les souris porteuses d'une invalidation du gène de l'aromatase présentent un nombre de follicules primordiaux et primaires formés inférieur aux souris possédant une enzyme de conversion fonctionnelle, suggérant là encore l'implication des œstrogènes dans le bon déroulement de ce processus. En revanche un traitement par des œstrogènes juste avant la puberté restaure l'expression altérée des facteurs de croissance folliculaire tels que Gdf9 (Britt *et al.*, 2004).

Par invalidation des récepteurs (souris):

Dans le but de comprendre le rôle des œstrogènes, des modèles de souris KO ont été créés dans lesquels les gènes contrôlant l'expression des récepteurs de ces hormones ont été invalidés. Considérant que les 3 types de récepteurs principaux sont les ER α , ER β et Gper [*les récepteurs seront évoqués plus en détails dans une autre section de ce manuscrit : Introduction. II 2 : Les récepteurs des œstrogènes*], différents KO ont été générés : ER α KO, ER β KO, ER $\alpha\beta$ KO et GperKO. L'impact de ces invalidations sur l'ovaire et particulièrement la formation folliculaire est variable. Plusieurs études (Schomberg *et al.*, 1999 ; Dupont *et al.*, 2000 ; Lubahn *et al.*, 1993) rapportent que les souris ER α KO présentent bien des follicules primordiaux et primaires, suggérant que l'histogenèse des follicules se déroule normalement. La même chose est rapportée chez les animaux ER β KO (Krege *et al.*, 1998; Dupont *et al.*, 2000) et Gper KO (Otto *et al.*, 2009). Mais les animaux adultes ER $\alpha\beta$ KO (portant

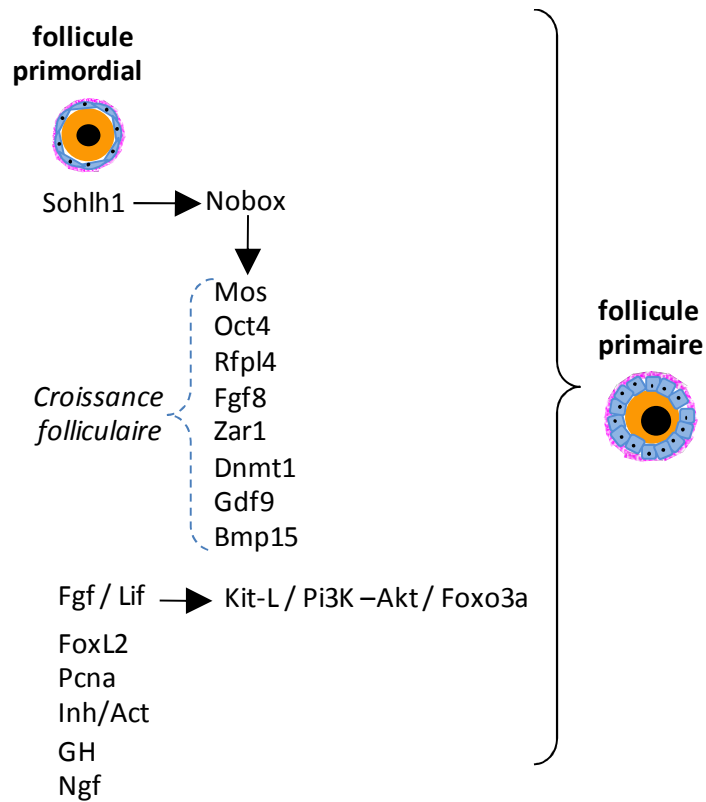


Figure 13 : Initiation de la croissance folliculaire.

La première étape de la croissance folliculaire est la transition du follicule primordial vers le stade primaire.

une double invalidation), bien que possédant des follicules primordiaux et primaires, présentent un défaut de prolifération des cellules de la granulosa et des structures rappelant les tubules séminifères et les cellules de Sertoli chez le mâle (Couse *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 2000). Toutefois, ces études ne font pas mention de comptages des follicules aux différents stades, rendant impossible l'appréciation de la quantité de follicules primordiaux ou primaires formés chez ces animaux génétiquement modifiés par rapport aux témoins. Par ailleurs, si la formation des follicules primordiaux a été perturbée, créant par exemple des MOF, ces structures transitoires auraient pu disparaître bien avant l'âge adulte, âge auquel sont observés les ovaires de ces souris KO.

Par utilisation d'antagonistes des récepteurs (*in vitro*):

À la naissance, la mise en culture organotypique d'ovaires de souris en présence d'œstrogènes entraîne l'apparition de MOF. Le même phénomène est observé avec des agonistes chimiques spécifiques de récepteurs ER α ou ER β , se fixant sur les récepteurs et les maintenant actifs. En revanche, si les œstrogènes sont administrés avec un antagoniste des récepteurs (qui s'y fixe sans les activer), les effets disparaissent, démontrant que ce sont bien les œstrogènes et leur interaction avec leurs récepteurs qui sont à l'origine de l'apparition des MOF (Chen *et al.*, 2009). Par ailleurs, la culture organotypique d'ovaires de hamster en présence de *Gper small interfering RNA* inhibe la formation folliculaire induite par E2, démontrant la participation de Gper dans la formation des follicules primordiaux (Wang *et al.*, 2008b).

3. L'OVAIRE IMMATURE

A. La croissance folliculaire

i. *Transition follicule primordial / follicule primaire*

L'interaction Sdf1 / Cxcr4 maintient le follicule primordial à l'état inactif, participant ainsi à la gestion du pool de follicule et évitant sa déplétion rapide par recrutement trop précoce (Holt *et al.*, 2006), tout comme l'AMH (Durlinger *et al.*, 2002) et l'inhibine (Myers *et al.*, 2009). L'entrée en croissance des follicules résulte donc du déséquilibre de la balance entre les facteurs de quiescence et les facteurs de croissance en faveur de ces derniers.

La voie de la Pi3K / Akt a déjà été évoquée pour son rôle dans la formation des follicules primordiaux. Elle est aussi très impliquée dans la transition vers le stade « primaire ». En effet, Akt réduit l'expression de Foxo3 (figure 11A), impliqué dans la quiescence folliculaire, afin de permettre la transition du follicule primordial vers primaire. Les facteurs impliqués dans cette transition sont présentés en figure 13. L'action de Foxo3 (évoquée précédemment lors de la présentation de la voie Pi3K, voir figure 11A) est également essentielle non pas à la transition « primo/primaire » en tant que telle mais à son ralentissement en vue d'éviter le recrutement anarchique et prématuré des follicules qui conduirait à la déplétion du stock et une sénescence ovarienne précoce (Castrillon *et al.*, 2003). En réduisant l'expression de Foxo3, l'inhibition qu'il exerce sur les Bmp est levée, permettant la

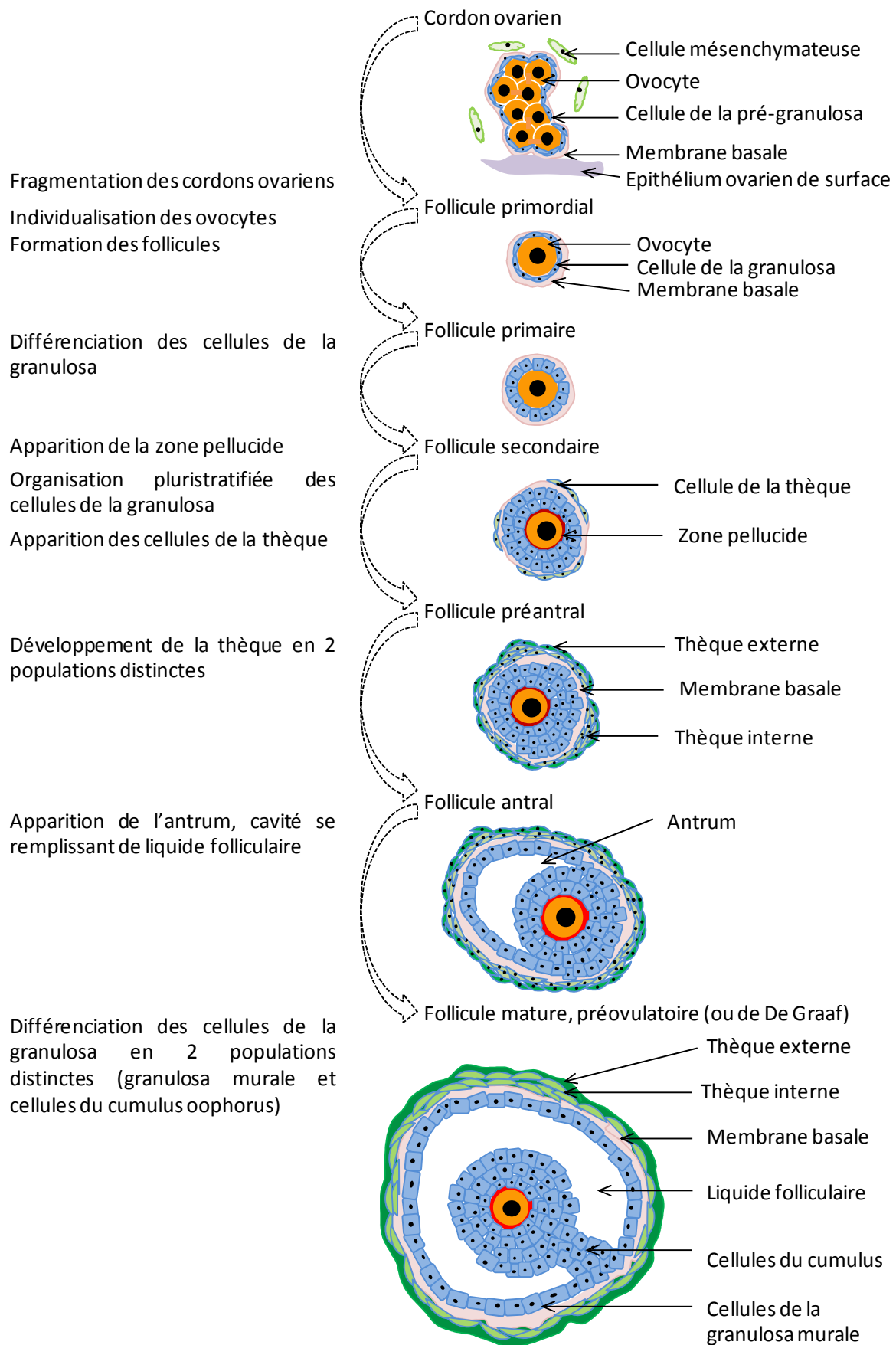


Figure 14 : La croissance folliculaire

prolifération des cellules de la granulosa. L'activité d'Akt est modulée notamment par 2 facteurs : Pdk1 et Pten. Ce sont des facteurs impliqués dans la quiescence et la survie des ovocytes. Leur absence conduit au recrutement précoce des follicules et donc à la dégénérescence et à l'épuisement de la réserve folliculaire. Cette voie de signalisation est essentielle au bon développement ovarien (Morita *et al.*, 1999; Cecconi *et al.*, 2012).

L'expression des Ngf se poursuit au stade « follicule primordial » et l'inhibition spécifique de leurs récepteurs induit un ralentissement de la transition vers le stade « follicule primaire » (Nilsson *et al.*, 2009). Cette transition est en revanche favorisée par l'hormone de croissance (*Growth Hormone, GH*) (Slot *et al.*, 2006).

Sohlh1 est un régulateur clé du développement ovarien. Il n'a pas d'influence sur les gènes gouvernant la méiose et la mort cellulaire mais sa délétion empêche la formation des follicules primaires (Pangas *et al.*, 2006). Il est notamment impliqué dans la régulation de Nobox, lui-même régulateur de l'expression de plusieurs gènes ovocytaires, tels que Mos, Oct4, Rfpl4, Fgf8, Zar1, Dnmt1, Gdf9 et Bmp15 (Rajkovic *et al.*, 2004; pour revue Sanchez & Smitz, 2012).

FoxL2, facteur somatique, est essentiel à la maturation des cellules de la granulosa, qui passent d'une forme aplatie à une forme cuboïde lors de la transition « follicule primo/primaire ». En l'absence de cette maturation, le follicule est incapable de se développer et entre en apoptose (Uhlenhaut & Treier, 2006). D'autres facteurs ont été avancés comme acteurs de la transition « follicule primordial vers follicule primaire ». C'est le cas de Fgf7 et Lif (respectivement Fibroblast Growth Factor et Leukemia Inhibitory Factor) dont l'action promotrice de la transition a été rapportée *in vitro* chez le rat par modulation de l'expression de Kit-Ligand (Kezele *et al.*, 2005a). Il a été décrit que Pcn1 régulait l'apoptose permettant la formation des follicules primordiaux. Mais il est aussi impliqué dans la prolifération des cellules somatiques et son absence, en limitant le nombre de cellules somatique disponible pour un seul ovocyte, altère la transition « primo/primaire » (Xu *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'avancement méiotique constitue une sorte d'horloge cellulaire déterminant si un follicule peut ou non poursuivre son développement. Un follicule contenant un ovocyte n'ayant pas atteint le stade diplotène sera incapable d'effectuer sa transition « primo/primaire » (Yang & Fortune, 2008). Pcn1 a là aussi un rôle régulateur, intervenant dans la réparation de l'ADN endommagé (Essers *et al.*, 2005) et permettant à l'ovocyte d'atteindre un état méiotique satisfaisant. À l'inverse, les souris dont le gène Scp1 (impliqué dans la régulation de l'avancement méiotique) a été invalidé atteignent le stade diplotène plus tôt que les souris normales et entament leur histogenèse folliculaire plus tôt (Paredes *et al.*, 2005). Les cellules de la granulosa changent de forme et deviennent cubiques, marquant morphologiquement la transition au stade primaire.

ii. Croissance folliculaire terminale

Le follicule primaire va se développer et croître, subissant de multiples changements morphologiques (figure 14). Au stade « secondaire », caractérisé par l'apparition d'une seconde couche de cellules de la granulosa, la zone pellucide se forme. Elle est sécrétée par l'ovocyte et les cellules de la granulosa (Maresh *et al.*, 1990), établissant une séparation entre les deux types cellulaires. Cependant des prolongements cytoplasmiques émis par les cellules somatiques assurent une communication avec la cellule germinale à travers cette zone, permettant le passage des molécules de signalisation telles

que Gdf9, produit par l'ovocyte, facteur de croissance pour les cellules de la granulosa (Albertini *et al.*, 2001). Gdf9 serait par ailleurs impliqué dans le recrutement des cellules mésenchymateuses à l'origine de la thèque. La thèque est une population de cellules somatiques liée au follicule et se développant au delà de la membrane basale. Les cellules de la thèque et de la granulosa sont en étroite collaboration, d'abord par leurs échanges de facteurs de croissance, ensuite pour la production d'hormones (pour revue, Orisaka *et al.*, 2009).

Au stade pré-antral, les cellules de la thèque se répartissent en deux sous-populations :

- la thèque interne, très vascularisée, au contact direct de la membrane basale, collaborant avec les cellules de la granulosa pour la production d'hormones

- la thèque externe, dont l'organisation autour de la thèque interne est plus lâche et qui n'a pas d'activité de production hormonale (pour revue, Magoffin, 2005).

Au stade antral, des petites cavités se creusent parmi les cellules de la granulosa, qui convergent en une cavité unique, l'antrum, contenant un liquide folliculaire. Ce liquide serait issu d'un gradient osmotique se mettant en place entre le compartiment vasculaire (établi dans la thèque interne) et l'intérieur du follicule (pour revue, Fahiminiya & Gerard, 2010).

Dans le follicule mature pré-ovulatoire, les cellules de la granulosa se répartissent en deux sous-populations :

- la granulosa dite « murale », composée de cellules bordant la lame basale et contribuant à la production hormonale

- le cumulus oophorus (à la base de l'ovocyte) sécrète, sous l'influence conjointe de facteurs hormonaux et d'origine germinale, des molécules conduisant à sa propre rupture pour permettre l'ovulation (Vanderhyden, 1993).

Au cours du développement folliculaire dans l'ovaire mature, la membrane basale du follicule ovarien s'adapte constamment à la croissance du follicule qu'elle entoure grâce à une dynamique de synthèse de nouveaux composants / dégradation par des protéases. Au moment de l'ovulation, la membrane se rompt pour permettre l'expulsion de l'ovocyte (Bjersing & Cajander, 1974) puis ses composants prolifèrent à nouveau pour réparer la cassure (Curry & Osteen, 2003). Elle est classiquement composée de fibres de collagène de type IV, laminine, nidogène, entactine, perlecan et fibronectine (pour revue, LeBleu *et al.*, 2007).

iii. Première vague de croissance folliculaire

- Origine

Le destin des follicules observés à 3 jpn chez le rat est guidé par leur genèse. Ainsi, il s'établirait une sorte de « progression logique » dans l'ordre de recrutement des follicules. (Henderson & Edwards, 1968; Hirshfield, 1992). Les cellules somatiques quiescentes depuis le milieu de la gestation ont une forme arrondie, elles sont situées au cœur de l'ovaire et forment avec les premières cellules germinales entrées en quiescence les follicules destinés à initier leur croissance

	Follicules de la première vague	Follicules en croissance cyclique
Morphologie / « âge des cellules »	Cellules de la granulosa aplaties (mitoses précoces)	Cellules de la granulosa arrondies (mitoses plus tardives)
Vitesse de croissance	Rapide	Plus lente
AMH / AMH-R	Expression dans la granulosa du stade « primaire » à « pré-antral »	Expression dans la granulosa du stade « primaire » à « petit antral »
Inhibine ba	Expression dès le stade « primaire »	Expression dans la granulosa du stade « secondaire » à « préovulatoire »
Aromatase (Cyp19)	Expression dès le stade « primaire »	Expression dans la granulosa du stade « secondaire » à « préovulatoire »
SF-1	D'abord exprimé majoritairement dans la thèque, puis surtout dans la granulosa autour de 15 JPN	Majoritairement exprimé dans la thèque, légère expression dans la granulosa
LH-R	Exprimé par les cellules de la thèque	Exprimé par les cellules de la thèque Exprimé par les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires

Tableau 1 : Caractérisation des premières vagues de croissance folliculaire chez l'animal immature par rapport au recrutement cyclique chez l'adulte (références dans le texte).

très tôt après la naissance (Hirshfield, 1992) dès 3 jpn. Ces premiers follicules en croissance se développent par vagues successives indépendamment des facteurs endocrines centraux qui gouvernent le recrutement folliculaire cyclique au sein de l'ovaire adulte. Ainsi, les cellules somatiques prolifèrent, notamment sous le contrôle de Gdf9, facteur de croissance sécrété par les cellules germinales des follicules en croissance et dont les récepteurs sont exprimés par les cellules somatiques (Mazerbourg & Hsueh, 2003). Celles-ci expriment alors PcnA, marqueur de prolifération détecté dès l'entrée en croissance (Oktay *et al.*, 1995). La thèque commence à s'organiser vers 9 jpn et les premiers follicules antraux apparaissent peu avant 15 jpn (Mazaud *et al.*, 2002). Mais ces premiers follicules presque à maturité n'atteignent pas l'ovulation et entrent tous en atresie au stade antral (McGee *et al.*, 1998) probablement parce que les concentrations circulantes de gonadotropines au moment où ces follicules atteignent le stade pré-antral ne sont pas optimales. En effet ce type de follicule est très sensible aux gonadotropines (Wu *et al.*, 2000).

- Spécificités et variations hormonales associées

Les premières vagues de croissance sont qualitativement différentes des vagues de recrutement cyclique caractéristiques de l'animal adulte (tableau 1). Ainsi, les follicules des premières vagues sont morphologiquement différents des autres de par l'origine de leurs cellules somatiques (issues de mitoses précoces ou tardives, Hirshfield, 1992). Par ailleurs les follicules participant à ces premières vagues de croissance grandissent plus vite que ceux prenant part au recrutement cyclique chez l'adulte, la prolifération des cellules somatiques étant plus rapide chez les animaux immatures (Arendsen de Wolff-Exalto & Groen-Klevant, 1980). L'expression de divers facteurs est également modifiée entre les follicules des premières vagues et les autres. Par exemple, dans l'ovaire adulte, l'AMH est exprimée dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance entre les stades « primaire » et « petit antral » (Hirobe *et al.*, 1992) et son récepteur (AMHRII) suit le même schéma d'expression (Baarends *et al.*, 1995). Les stades de maturation plus avancés (grand antral / pré-ovulatoire) perdent cette expression. Si l'expression de l'AMH et AMHRII est bien détectée au stade pré-antral, les follicules au stade « petit antral » de la première vague de croissance à 20 jpn ne semblent pas exprimer l'AMH et son récepteur. Cette expression n'apparaît au stade « petit antral » qu'à 25 jpn (Baarends *et al.*, 1995). Si l'on considère que l'AMH est un facteur de quiescence protecteur contre l'épuisement précoce de la réserve folliculaire, on peut supposer que cette hormone et son récepteur seraient moins exprimés par les follicules de cette première vague afin d'achever leur croissance plus rapidement que les follicules impliqués dans le recrutement cyclique, ce qui est cohérent avec les observations selon lesquelles la vitesse de croissance est effectivement plus grande chez l'animal immature et diminue avec l'âge jusqu'à la puberté (Arendsen de Wolff-Exalto & Groen-Klevant, 1980). L'inhibine est un facteur impliqué dans la régulation de la fonction endocrine ovarienne et son contrôle via l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Son étude chez l'animal immature a révélé des différences de schéma d'expression. En effet, alors que l'inhibine est exprimée par les cellules de la thèque et de la granulosa à tous les stades de croissance folliculaire au cours des premières vagues comme au cours du recrutement cyclique, l'inhibine ba

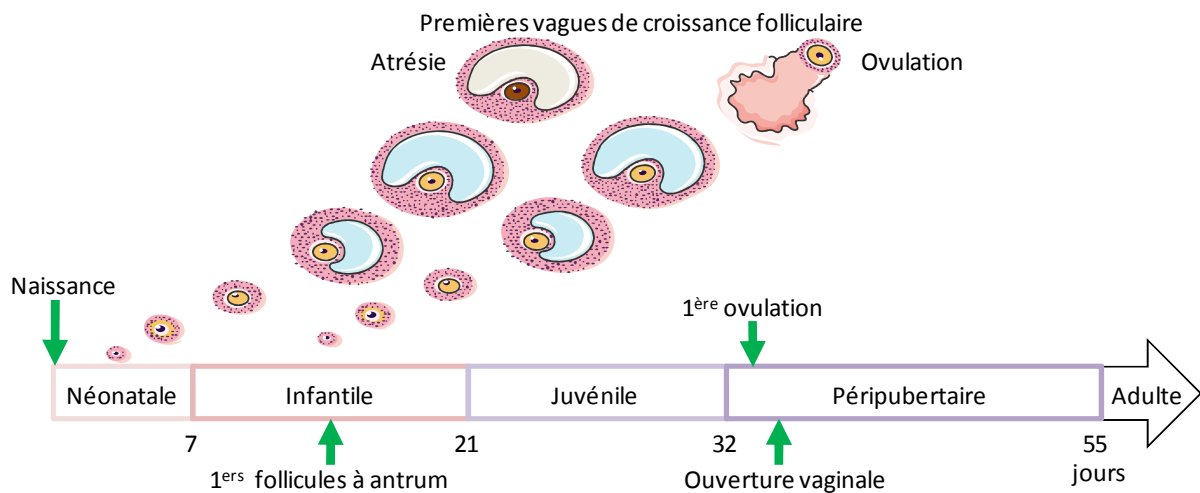
présente un schéma d'expression différent. Chez la ratte adulte, ce type d'inhibine est exprimé uniquement par les cellules de la granulosa dans les follicules sains entre les stades « secondaire » et « préovulatoire » (Meunier *et al.*, 1988). Chez l'animal immature en revanche, plus la vague de croissance est initiée tôt, plus l'expression de l'inhibine commence à un stade précoce du développement folliculaire. Ainsi, entre 5 et 15 jpn, elle est détectée dès le stade « primaire » mais seulement au stade « antral » à partir de 21 jpn (Guigon *et al.*, 2003a). L'aromatase (cyp19a1), enzyme impliqué dans la synthèse des œstrogènes, suit le même schéma d'expression (Hickey *et al.*, 1988; Mazaud *et al.*, 2002).

SF1 (Steroidogenic factor 1) est un facteur impliqué dans la régulation d'enzymes de la stéroïdogénèse (Lala *et al.*, 1992) dont l'aromatase (Carlone & Richards, 1997). Son expression a été détectée dès la fin de la 1^{ère} semaine dans l'ovaire de rat (Hatano *et al.*, 1994). Falender *et al.* et Liu *et al.* rapportent, après étude par hybridation *in situ* dans l'ovaire de rat, un schéma d'expression de SF1 modifié entre l'animal immature et mature (Falender *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2003). Ainsi SF1 serait majoritairement exprimé dans la granulosa chez l'animal immature avec une légère expression thécale et l'inverse serait observé chez l'adulte. Ceci est en contradiction avec les observations de Mazaud *et al.*, (Mazaud *et al.*, 2002, obtenues également par hybridation *in situ* dans l'ovaire de ratte) qui rapportent une forte expression dans la thèque à partir de 9 jpn. Toutefois, les animaux immatures utilisés par Falender *et al.* et Liu *et al.* étaient âgés de 26 jpn. Il est possible que le schéma d'expression évolue entre l'animal infantile, juvénile et mature (comme le schéma d'expression de l'aromatase) concomitamment avec l'évolution des taux d'œstrogènes. En revanche, le patron d'expression de la 3bHSD, autre enzyme stéroïdogène, est le même chez l'animal immature et mature : la 3bHSD est exprimée dans les cellules de la thèque dès leur apparition autour des follicules en croissance de la première vague mais pas dans les cellules de la granulosa (Juneau *et al.*, 1993).

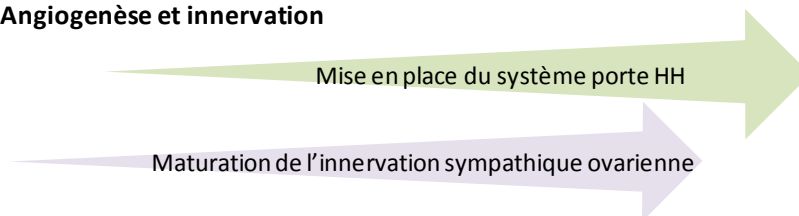
Les follicules en croissance présentent tous sur leurs cellules de la thèque des récepteurs à la LH. Toutefois les follicules préovulatoires sont les seuls à en posséder sur leurs cellules de la granulosa, ce qui permet - via des mécanismes de régulation médiés par les étages supérieurs de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique - de déclencher l'ovulation suite à une brusque augmentation de la concentration de LH circulante. Les follicules des premières vagues entrant en atresie avant le stade préovulatoire, aucun d'entre eux n'exprime ce récepteur sur ses cellules de la granulosa (Guigon *et al.*, 2003a).

Tous ces facteurs sont impliqués dans le dialogue qui s'établit progressivement entre l'ovaire et le cerveau et les variations d'expression observées selon l'âge de l'animal suggèrent que les premières vagues de croissance jouent un rôle dans la maturation de ce dialogue.

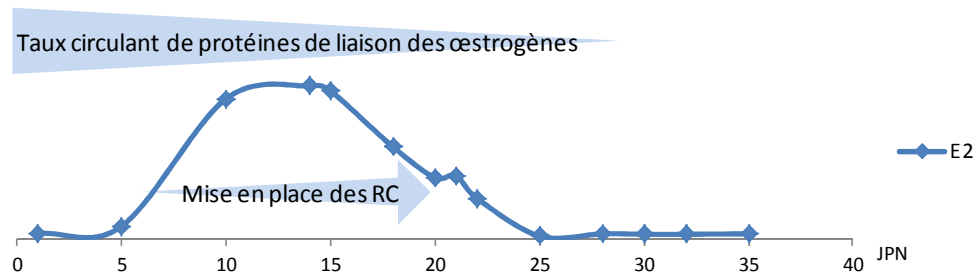
A : Les périodes du développement post-natal de la ratte



B : Angiogenèse et innervation



C : Les œstrogènes



D : Les gonadotropines

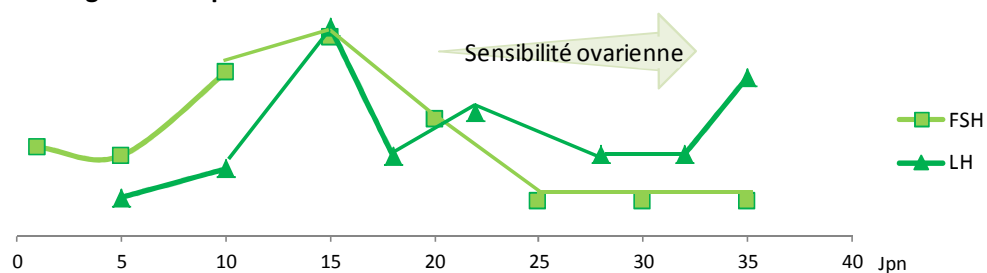


Figure 15 : Développement post-natal chez la ratte

HH : hypothalamo-hypophysaire ; RC : rétrocontrôle

Les taux d'œstrogènes présentés varient entre 0 et 60 pg/ml.

Les taux de LH varient entre 0 et 130 ng/ml. Les taux de FSH, initialement compris entre 0 et 1200 ng/ml, ont été divisés par 10 pour une meilleure lisibilité sur la figure.

D'après Van Cappellen *et al.*, 1989, Meijs-Roelofs *et al.*, 1973, Montano *et al.*, 1995.

- Chronologie du développement

D'après la chronologie du développement post-natal du rat (figure 15 A) décrite par Ojeda (pour revue, Ojeda *et al.*, 1980), les vagues de croissance se mettent en place dès la période dite « néonatale ».

- Période néonatale : 0 - 7 JPN.

Elle se déroule entre la naissance et le jour 7, date à laquelle apparaissent les premiers capillaires du système porte-hypophysaire (figure 15 A & B), support physique de la communication entre l'hypothalamus et l'hypophyse. Ce système porte va permettre la régulation fine des sécrétions de gonadotropines et atteint sa pleine maturité vers 40 jours (Glydon, 1957). Certains follicules, situés au cœur de l'ovaire, entrent en croissance (Hirshfield, 1992).

- Période infantile : 7 - 21 JPN.

Au cours de cette période, les taux d'œstrogènes, de FSH et LH (respectivement figure 15 C & D) sont au plus haut et en parallèle le taux de protéines de liaison des œstrogènes diminue (Raynaud *et al.*, 1971). Le taux de protéine de liaison des œstrogènes (alfa-fœtoprotéine (Afp) et Sex Hormone Binding Globulin (shbg)), très élevé chez l'animal néonatal, décroît progressivement (Puig-Duran *et al.*, 1979). L'injection d'Afp à des femelles immatures retarde l'apparition d'œstrogènes circulants libres et donc retarde la puberté (Greenstein, 1992). À l'inverse, des souris femelles dont le gène codant pour l'Afp a été inactivé présentent à l'âge adulte une infertilité (liée à un défaut d'ovulation) et une atteinte hypothalamique (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2008) semblable à ce qui peut être observé chez des femelles surexposées aux œstrogènes durant la vie périnatale (Navarro *et al.*, 2009). L'équilibre E2 libre / E2 lié est donc un point clé du contrôle du développement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de l'animal immature. Ces œstrogènes biologiquement actifs, bien que leur quantité soit faible, conduisent à la mise en place effective de leur fonction de rétrocontrôle sur la sécrétion de gonadotropines grâce à la présence de leurs récepteurs, rapportée dans l'hypothalamus et l'hypophyse dès le jour de la naissance, avec un pic d'expression entre 8 et 15 jpn (MacLusky *et al.*, 1979).

Contrairement aux œstrogènes circulants chez l'animal adulte (résultant d'une production ovarienne), les œstrogènes de l'animal immature semblent être d'origine surrénalienne. En effet, l'ablation de ces glandes entraîne la suppression des œstrogènes circulants (pour revue, Ojeda *et al.*, 1980). Il est possible que l'ovaire, encore immature et dont les schémas d'expression des enzymes stéroïdogènes se mettent en place et évoluent, coopère avec la glande surrénale. Celle-ci assurerait alors la partie de la synthèse des œstrogènes se déroulant dans les cellules de la thèque chez l'adulte (voir II.3 « la biosynthèse des œstrogènes » page 83). Les follicules qui produiront la première ovulation efficace entrent en croissance à la fin de cette période. En effet, il faut environ 19 jours à cet âge pour qu'un follicule primaire traverse les différents stades de maturation et atteigne l'ovulation. Ces premiers follicules ont besoin du taux de LH très élevé à cette période pour initier leur croissance. Une inhibition de la LH circulante à cet âge entraîne une forte réduction du nombre de follicules en croissance à l'approche de la puberté (Van Cappellen *et al.*, 1989).

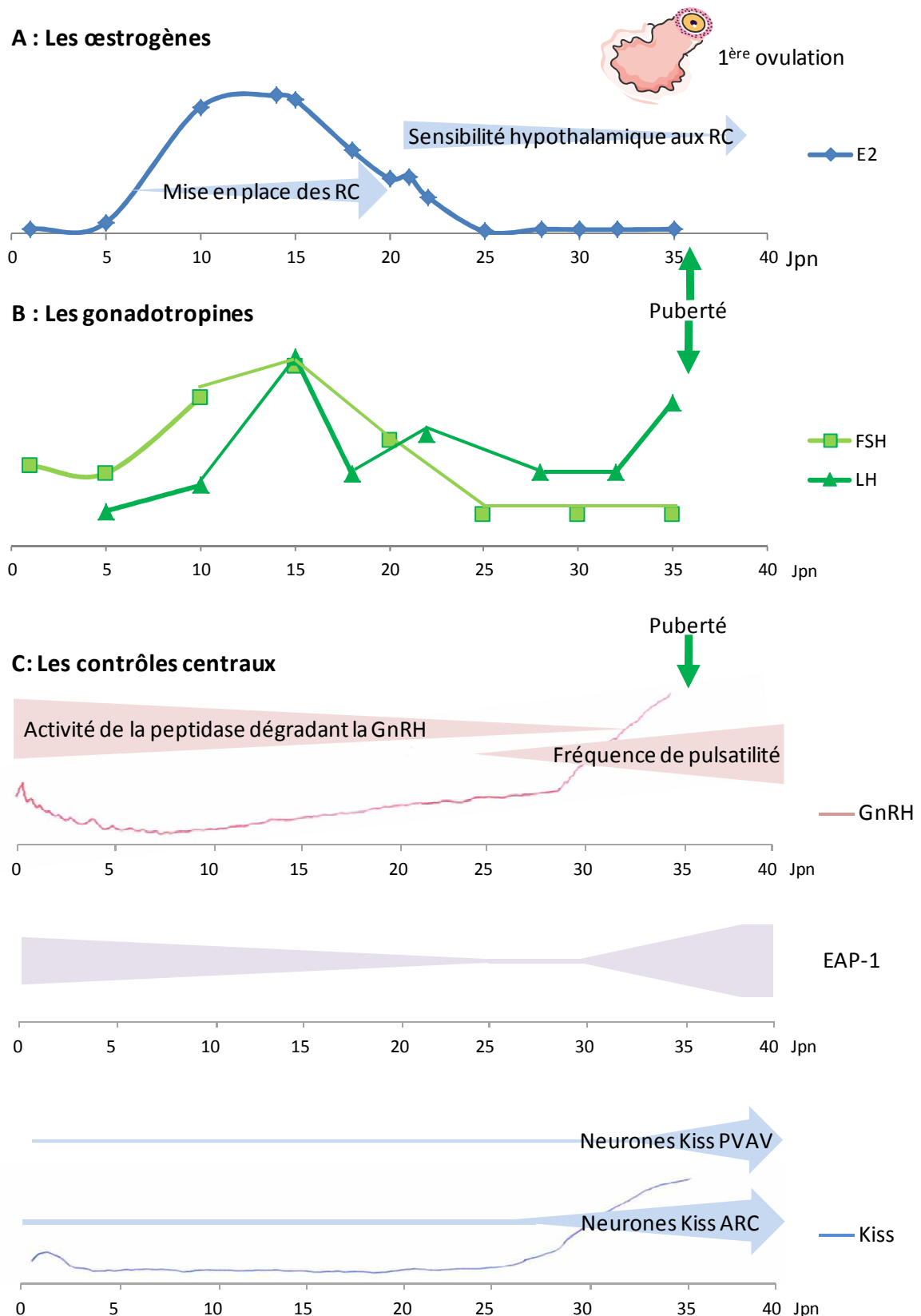


Figure 16 : Survenue de la puberté.

La survenue de la puberté est sous le contrôle de plusieurs facteurs. Références dans le texte.

- Période juvénile (ou pré-pubertaire) : 21 - 32 JPN.

Le taux de protéines de liaison des œstrogènes s'effondre (figure 15 C). A 23 jours est atteint le taux « adulte » de protéines de liaison des œstrogènes (Puig-Duran *et al.*, 1979). Cette levée de liaison entraîne la réduction considérable de la demi-vie des œstrogènes circulants, contribuant à la diminution de leur taux circulant (pour revue, Ojeda *et al.*, 1980). À la fin de la période juvénile, le taux de FSH est au plus bas. C'est également à cette période que le contrôle ovarien nerveux (sous la dépendance du système sympathique) se met en place (figure 15 B). L'ovaire est en effet capable de synthétiser et excréter la noradrénaline, neurotransmetteur sympathique. Cette capacité semble établie dès la semaine suivant la naissance mais n'est pleinement mature que vers la puberté (Ricu *et al.*, 2008). Ce neurotransmetteur est impliqué dans l'acquisition des récepteurs de la FSH par les cellules de la granulosa des follicules en croissance, leur conférant une capacité de réponse aux gonadotropines (Mayerhofer *et al.*, 1997). L'ovaire acquiert donc à cette période sa sensibilité aux gonadotropines, dont les taux circulants diminuent (figure 15 D). La capacité de fixation de la LH par l'ovaire reste basse et constante jusqu'à cet âge alors que la capacité à fixer la FSH augmente graduellement (Peluso *et al.*, 1976).

- Période péripubertaire : 32 - 55 JPN.

Le début de cette période est caractérisé par l'apparition d'un fluide dans l'utérus. Il semblerait qu'au cours de cette période, la sensibilité de l'hypothalamus au rétrocontrôle négatif exercé par les faibles doses d'œstrogènes diminue, favorisant ainsi la sécrétion de gonadotropines. En effet, le taux de LH, sécrété de façon plus ou moins pulsatile pendant la période infantile est resté bas durant toute la période juvénile. Mais les taux de gonadotropines circulant augmentent légèrement parallèlement à la diminution de la sensibilité hypothalamique au rétrocontrôle des œstrogènes (figure 16 A). Ceci stimule l'ovaire dont la production d'œstrogènes libres permet le déclenchement du pic de LH (figure 16 B) précédant la première ovulation qui survient vers 35 jpn (pour revue, Ojeda *et al.*, 1980). À cet âge, la capacité ovarienne de fixation des gonadotropines (LH comme FSH) subit une brusque augmentation (Peluso *et al.*, 1976), nécessaire à la réponse de l'organe aux gonadotropines circulantes.

Lors des premières vagues de croissance folliculaire, la réceptivité des follicules en croissance aux gonadotropines n'est pas encore optimale et les rétrocontrôles ne sont pas encore en place. Ceci conduit à l'atrésie de tous les follicules antraux. Mais la synthèse d'œstrogènes indique que le dialogue est initié entre l'organe fournisseur de follicules et producteur d'œstrogènes (l'ovaire) et l'organe producteur de gonadotropines (l'hypophyse). Les follicules entrant en croissance à la fin de la période juvénile bénéficient de la mise en place efficace des rétrocontrôles, ce qui permet la régulation des gonadotropines. La brusque augmentation de LH qui en résulte déclenche la première ovulation, marquant du même coup la puberté.

B. Maturation du système central et mécanismes de la puberté

La puberté est le moment où tous les systèmes précédemment décrits (maturité ovarienne, hormonale, centrale et même physique avec le développement du système porte) voient leurs organisations s'harmoniser pour devenir fonctionnels ensemble et permettre à l'animal de se reproduire. Trois facteurs centraux ont été identifiés comme étant des acteurs clés de la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et nécessaires à l'établissement de la puberté et au maintien de l'axe : la « Gonadotrophine Releasing Hormone » (GnRH), le « Enhanced At Puberty-1 » (EAP-1) et le kiss-peptide (figure 16 C).

La quantité d'ARNm GnRH augmente progressivement à partir de la naissance et atteint un pic d'expression vers 50 jours chez la souris femelle. Cependant le taux de transcription varie peu (Gore *et al.*, 1999). Il y a chez l'animal mâle immature un système de dégradation de la GnRH parallèle à sa synthèse qui explique que malgré la production de la molécule, son taux circulant soit proche de 0 (Yamanaka *et al.*, 1999). Cependant, à l'approche de la puberté, ce mécanisme de dégradation régresse, permettant l'augmentation du taux de GnRH jusqu'à un niveau adéquat pour le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Yamanaka *et al.*, 1999). On peut supposer que cette levée d'inhibition observée chez le mâle peut avoir lieu de la même façon chez la femelle. La sécrétion de GnRH n'est toutefois pas linéaire. Elle est pulsatile et sa fréquence de pulsativité varie avec l'avancée vers la maturité. Ainsi, vers 30 jours, la fréquence est d'un pulse toutes les 4 heures, alors qu'après la puberté (vers 40 jours), elle est de 1 pulse toutes les 40 minutes (Sisk *et al.*, 2001). Par ailleurs, le lien entre masse corporelle, métabolisme et puberté est établi depuis longtemps. Les animaux les moins nourris voient leur croissance ralentie et leur puberté retardée (Kennedy, 1957). La leptine, hormone produite par les adipocytes, semble être un facteur permissif essentiel à la survenue de la puberté. Les souris déficientes en leptine restent à l'état « prépubère » : elles sont acycliques et n'ovulent pas. Des injections de leptine restaurent leurs capacités reproductrices (Chehab *et al.*, 1996). Chez la ratte, un traitement avec de la leptine exogène avant la puberté avance la survenue de celle-ci (Chehab *et al.*, 1997). Il semble donc que la leptine soit à la fois le facteur régulant la prise alimentaire (induisant la restriction alimentaire chez l'adulte dont les besoins énergétiques sont moindres que chez l'individu en croissance) et l'indicateur annonçant au cerveau que le corps possède les réserves métaboliques nécessaires pour faire face à la dépense énergétique que représente la fonction de reproduction. La leptine est impliquée dans la régulation de la fréquence de pulsativité de la GnRH par un mécanisme indirect. En effet, les récepteurs de la leptine sont portés par des neurones hypothalamiques eux-mêmes connectés aux neurones à GnRH (Ahima, 2011). Les zones de l'hypothalamus impliquées dans la sécrétion de GnRH expriment également un autre facteur, le EAP-1. Les femelles privées de ce facteur, dont l'expression augmente physiologiquement lors de la puberté, voient leur puberté retardée mais aussi l'établissement de leurs cycles œstriens perturbée (Heger *et al.*, 2007), faisant de l'EAP-1 un élément non indispensable puisque les animaux continuent leur développement mais essentiel au fonctionnement normal du système. L'augmentation de EAP-1 est indépendante des œstrogènes et survient même chez des animaux ovariectomisés (Matagne *et al.*, 2009). Elle est également indépendante de la leptine puisqu'elle a lieu aussi chez les souris ob/ob (dépourvues de leptine) (Heger *et al.*, 2007).

L'élément déclencheur essentiel de la puberté est la maturité du système kiss. Le kiss-peptide est produit par des neurones spécialisés situés dans l'hypothalamus. Son récepteur (Kiss1r ou Gpr54) est exprimé dans les neurones à GnRH. En l'absence de signalisation Kiss (souris KO Gpr54) la sécrétion des 2 gonadotropines (LH et FSH) est perturbée, indiquant que Kiss agit en amont : c'est le régulateur de la sécrétion de GnRH (Messager *et al.*, 2005). Il a un rôle primordial dans l'établissement de la puberté : en l'absence de récepteur Gpr54, il n'y a pas de puberté, ni chez l'homme (de Roux *et al.*, 2003) ni chez la souris (Seminara *et al.*, 2003). Une exposition précoce au kiss-peptide entraîne en revanche l'avancement de la puberté (Navarro *et al.*, 2004). Les neurones kiss sont en fait subdivisés en deux populations dont les corps cellulaires sont localisés dans deux régions hypothalamiques différentes : le noyau arqué (ARC) et le noyau périventriculaire antéro-ventral (PVAV). Dans l'ARC, des corps cellulaires et des fibres neuronales (axones) sont détectés dès la naissance (Desroziers *et al.*, 2012). Le nombre de corps cellulaires diminue en période infantile et reste bas en période juvénile puis augmente en période péripubertaire. Le nombre de fibres augmente légèrement en période infantile mais diminue aussi en période juvénile pour augmenter à nouveau aux alentours de la puberté. Dans le PVAV, aucun corps cellulaire n'est détecté à aucun stade de développement par immunoréaction contre le kiss-peptide (probablement à cause du transfert très rapide du peptide vers l'axone). En revanche, le nombre de fibres suit la même évolution au cours du temps que les fibres de l'ARC mais avec un léger décalage : l'augmentation survient juste après la puberté. Parallèlement, l'expression de Kiss et de son récepteur Gpr54 dans ces régions à l'approche de la puberté a été étudiée par Li *et al.* (Li *et al.*, 2012). L'expression de l'un comme de l'autre augmente dans l'ARC -qui contient aussi des cellules productrices de EAP-1 (Heger *et al.*, 2007)- juste avant la puberté et un peu plus tardivement dans le PVAV, permettant l'établissement de la régulation des neurones à GnRH et donc la régulation de la synthèse des gonadotropines. L'augmentation de l'expression de kiss-peptide juste avant la puberté coïncide avec l'augmentation de la proportion de neurones à GnRH accolés aux fibres des neurones kiss (Clarkson & Herbison, 2006) et ceci permet de moduler la fréquence de pulsativité de la GnRH qui entraîne, conjointement avec l'augmentation légère de la fraction libre biologiquement active d'œstrogènes, le pic de LH déclenchant la première ovulation.

La puberté résulte donc de deux processus : d'une part un processus « ascendant » de mise en place des rétrocontrôles lié aux taux d'hormones ovariennes circulantes, d'autre part un processus « descendant », indépendant de ces hormones, lié au déclenchement de la fonctionnalité du centre de contrôle de la fonction de reproduction (l'axe hypothalamo-hypophysaire).

C. La puberté : critères cliniques et établissement de la cyclicité

Chez les rongeurs, le premier signe observable de la puberté est l'ouverture vaginale. En effet, chez la femelle immature la cavité vaginale n'est pas ouverte sur l'extérieur. Cette ouverture survient aux alentours de 35 jours chez la ratte et permet la surveillance de l'apparition du premier œstrus par frottis vaginaux quotidiens. L'œstrus mis en évidence dans le vagin correspond au moment de l'ovulation ovarienne et donc à la période de fécondabilité de la femelle.

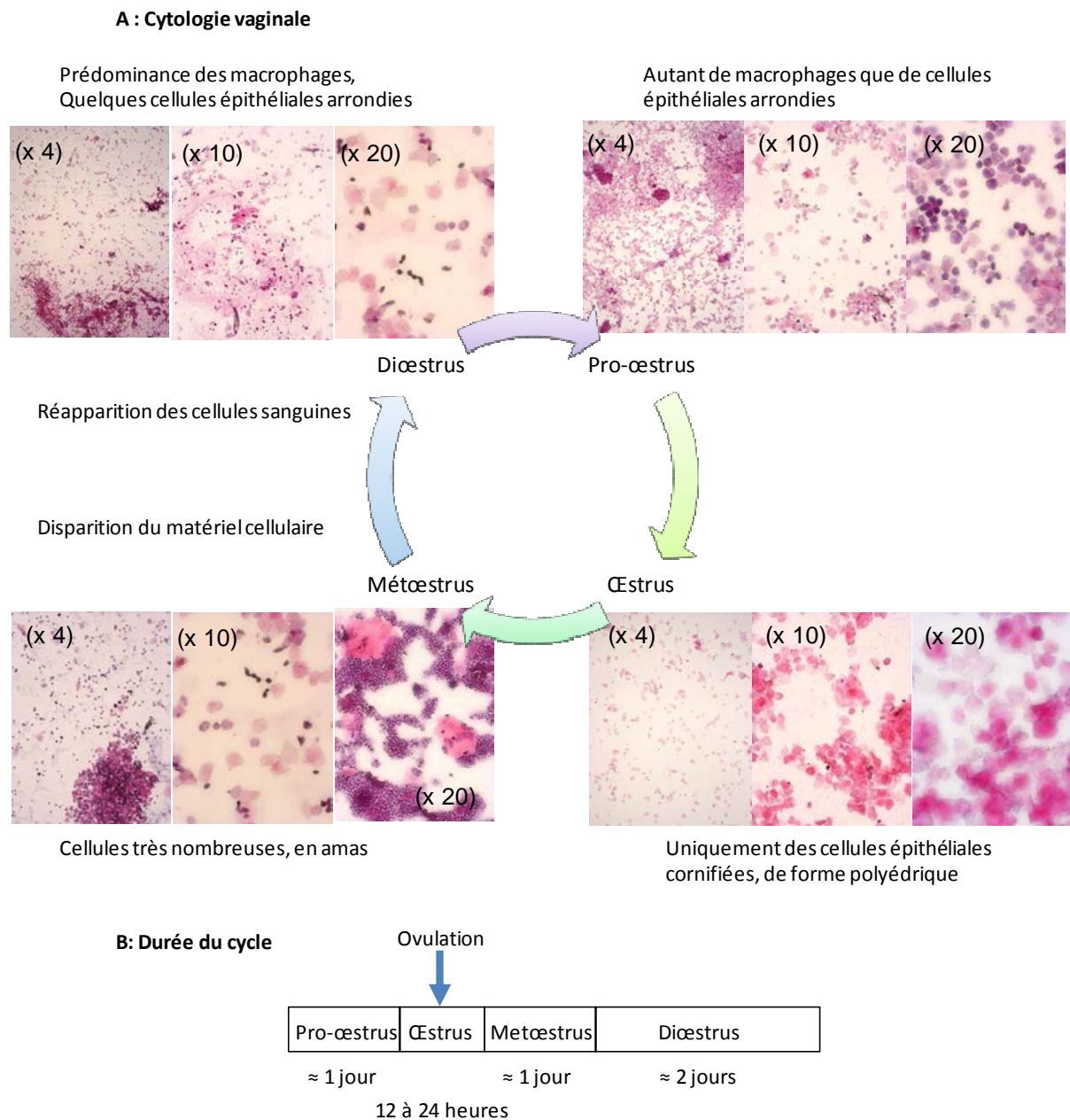


Figure 17 : Cycles estriens chez la ratte.

A : Cytologie vaginale : la composition cellulaire des frottis (ici colorés à l'hématoxyline / éosine et observés en microscopie optique) reflète l'avancée du cycle. Entre parenthèses est indiqué l'objectif du microscope.

B : Durée du cycle : un cycle dure 4 à 5 jours, les différentes phases observées ont des durées variables.

Un cycle œstrien normal chez la ratte dure 4 à 5 jours et se compose de différentes phases : diœstrus, pro-œstrus, œstrus et metœstrus (figure 17). Le cycle œstrien correspond à l'ensemble des changements physiologiques intervenant dans l'appareil génital. Chaque phase de ce cycle peut être identifiée par la composition cellulaire des frottis vaginaux. Le stade diœstrus est le plus long. Il dure environ deux jours chez la ratte et la cytologie vaginale correspondante est caractérisée par la prédominance des leucocytes, des cellules sanguines appartenant au système immunitaire. Au stade pro-œstrus, d'une durée d'environ 1 jour, les cellules épithéliales arrondies et nucléées représentent la moitié de la population cellulaire composant les frottis vaginaux. Lors de l'œstrus, il n'y a que des cellules épithéliales cornifiées, sans noyau, de forme polyédrique. Ce stade est le plus court, il dure entre 12 et 24 heures. Le metœstrus (environ un jour) est caractérisé par l'abondance de cellules en amas et les macrophages refont leur apparition (pour revue, *Stoker et al.*, 2001).

4. L'OVAIRE MATURE

Les cycles œstriens dans l'ovaire adulte sont sous dépendance hormonale. L'ovaire a alors deux rôles intimement liés : préparer la cellule germinale à l'ovulation et donc à la fécondation et produire des hormones participant à sa propre régulation grâce à l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et contribuant à la mise en place dans l'utérus d'un environnement favorable à la gestation en cas de fécondation de la cellule germinale.

A. Gestion du stock d'ovocytes : dynamique de recrutement

De façon cyclique, une cohorte de follicules sort de l'état de quiescence dans lequel elle était plongée depuis la période néonatale pour entrer en croissance et permettre l'ovulation (figure 18 A). Les facteurs induisant le « réveil » de seulement une partie de ces follicules à chaque cycle alors que les autres restent en quiescence ont été évoqués dans la section « transition primo/primaire » (page 43). Seraient impliqués dans ce réveil des facteurs de croissance (régulés notamment par Nobox), des voies de signalisation (Kit, PI3K), la balance Inh/Act et des facteurs endocrines (progestérone, œstrogènes, AMH et FSH bien qu'à ce stade les follicules y soient moins sensibles qu'à des étapes ultérieures de leur développement). Les souris dont le gène de l'Amh a été invalidé voient leur stock folliculaire épuisé précocement pour cause de recrutement trop rapide : à 4 mois les souris KO ont un stock de follicules primordiaux déjà inférieur à celui des animaux témoins et à 13 mois, leur réserve folliculaire est quasiment nulle (*Durlinger et al.*, 1999). L'action de la FSH avant le stade antral est controversée. C'est à ce stade qu'elle assure la sélection d'une partie seulement des follicules pour poursuivre leur développement (*Insler et al.*, 1990). Cette sélection pourrait être liée à la quantité d'AMH exprimée par les follicules. En effet, l'AMH étant un facteur de ralentissement du recrutement, ceux qui en expriment très peu sont plus sensibles que les autres à la FSH (*Durlinger et al.*, 1999). Elle pourrait également être liée à l'état prolifératif des cellules de la granulosa et à leur quantité de récepteurs de la FSH. En effet, avant le stade antral, ce sont les œstrogènes qui stimulent la prolifération des cellules de la granulosa. Puis la FSH prend le relais, induit l'apparition de l'antrum chez les follicules préalablement stimulés par les œstrogènes et stimule à son tour la prolifération des cellules de la granulosa (*Goldenberg et al.*, 1972).

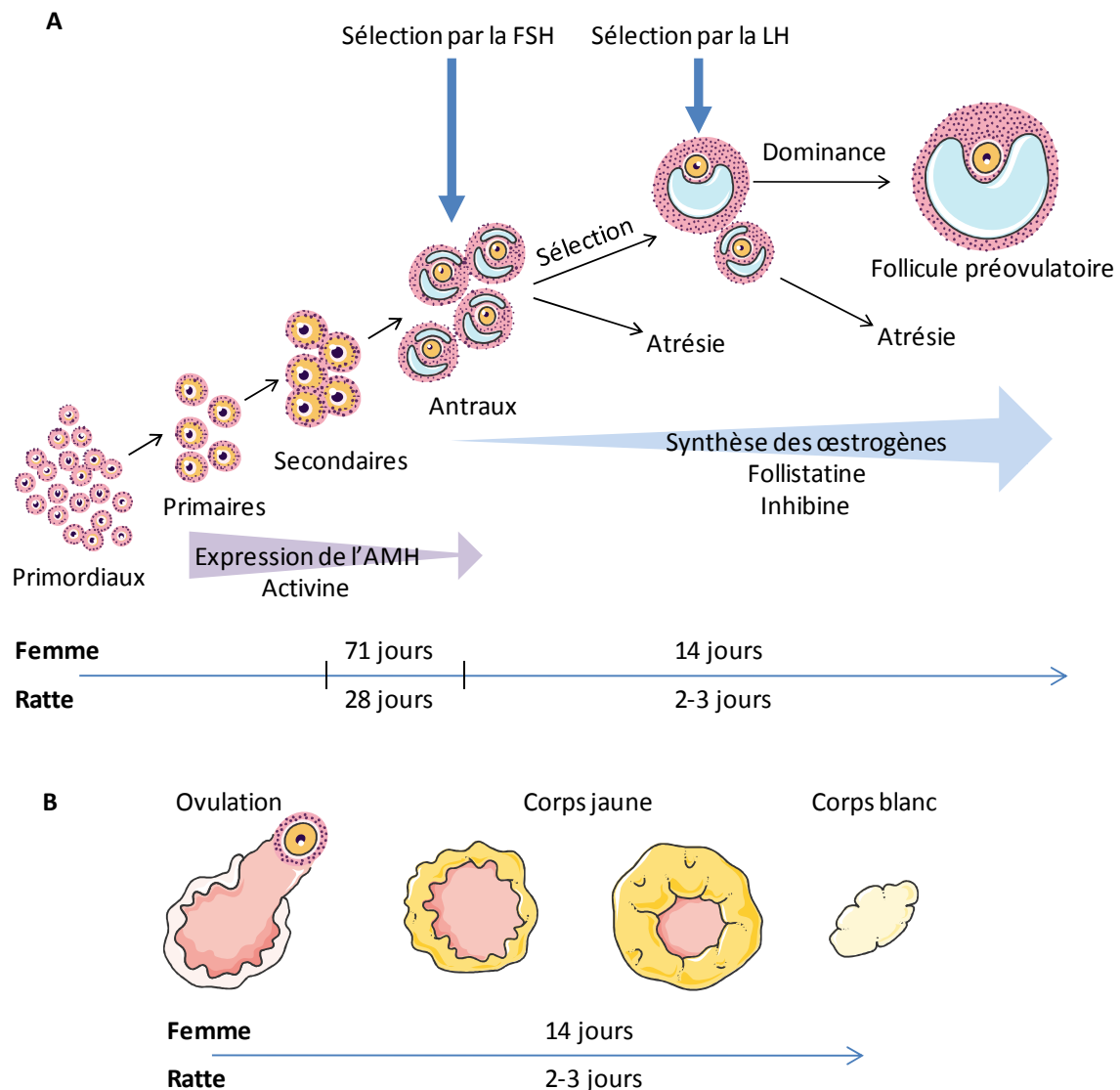


Figure 18: Recrutement et développement folliculaire dans l'ovaire mature.

A : Une cohorte de follicules primordiaux sort de son état de quiescence et commence à croître. Les taux circulants de gonadotropines assurent la sélection au stade antral d'une partie de cette cohorte qui survit et poursuit son développement. Les autres follicules sont éliminés par atresie. L'un des follicules sélectionnés devient dominant, ce qui conduit à l'atresie des follicules subordonnés. Ce processus est bien plus long chez la femme que chez la ratte, ce qui est cohérent avec la durée des cycles estriens (respectivement de 28 et environ 4 jours) (Modifié d'après McGee & Hsueh, 2000).

B : Évolution post-ovulatoire : lutéinisation

L'ovulation est la séparation entre la cellule germinale et une partie des cellules du cumulus d'une part et le reste des cellules somatiques folliculaires d'autre part. Ces cellules somatiques forment un amas appelé corps jaune qui dégénère en corps blanc fibreux.

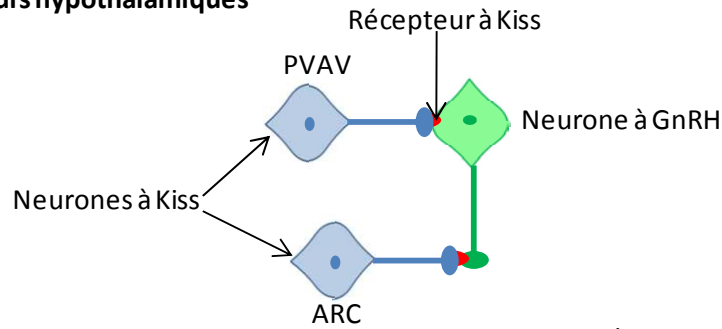
Les follicules non sélectionnés sont éliminés par atresie. L'atresie commence par l'entrée en apoptose des cellules de la granulosa. Elles ne répondent plus aux signaux de survie (notamment la FSH), ce qui active les voies de l'apoptose (Matsuda *et al.*, 2012). Parmi les follicules sélectionnés, certains exprimant les récepteurs à la LH sur leurs cellules de la granulosa deviennent dominants (pour revue, Driancourt, 2001) et expriment également fortement la follistatine et l'inhibine (Lin *et al.*, 2003), deux molécules réfrénant la stimulation des autres follicules. La dominance est variable selon les espèces : elle ne concerne qu'un seul follicule (sur deux ovaires) chez les espèces mono-ovulantes (telles que l'espèce humaine, la chèvre ou la vache) mais en concerne en moyenne 10 à 12 chez le rat répartis entre les deux ovaires. Les follicules non dominants expriment fortement l'Amh (facteur de quiescence) alors que l'expression de cette hormone, maximale au stade secondaire, diminue à mesure que le follicule approche de la maturité (Weenen *et al.*, 2004; Kedem-Dickman *et al.*, 2012). Les follicules non dominants entrent en atresie tandis que le dominant devient préovulatoire.

B. Compétence méiotique et ovulation.

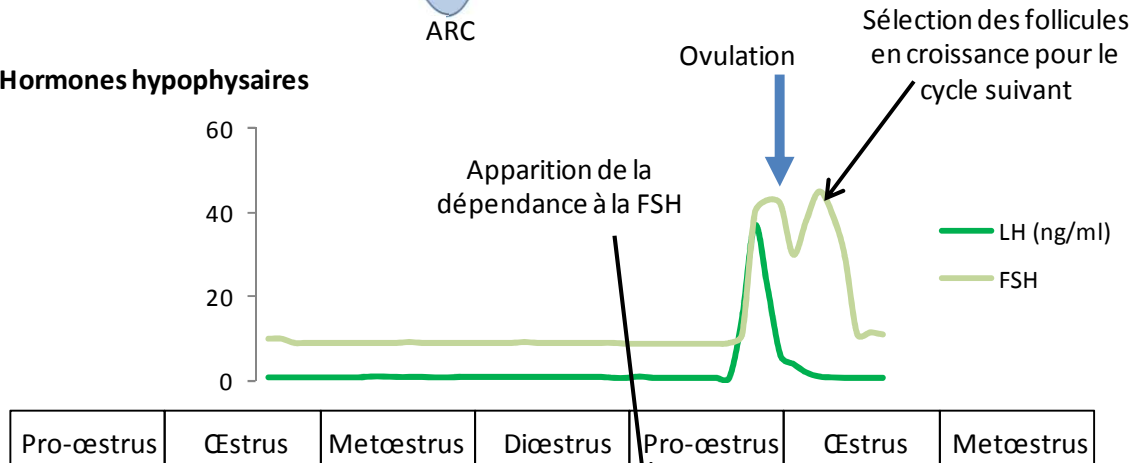
Nous avons vu précédemment (figure 5) que la méiose de l'ovocyte est bloquée au stade diplotène de prophase I depuis la période néonatale. L'augmentation brutale du taux circulant de gonadotropines induit chez les follicules antraux une reprise de la méiose par un mécanisme indirect. En effet, l'ovocyte ne porte pas de récepteurs à la LH, contrairement aux cellules de la granulosa murale (pour rappel, voir figure 14, page 44). Le mécanisme de reprise méiotique est encore à l'heure actuelle mal connu mais dépend de la décharge de LH et de la levée du maintien en quiescence assuré notamment par le taux intra-ovocytaire élevé d'AMPc (pour revue, Mehlmann, 2005). Elle dépendrait également du taux de FSH puisqu'en son absence, des expériences *in vitro* ont montré qu'une partie des ovocytes restaient immatures (Demeestere *et al.*, 2012). Cette reprise méiotique s'arrête toutefois au stade de métaphase II. La fin de la méiose ne se déroule qu'en cas de fécondation.

L'ovulation correspond à la rupture du follicule préovulatoire mûr suite à l'augmentation brutale du taux de gonadotropines. Le pic de LH induit des changements vasculaires (augmentation du flux sanguin folliculaire, hyperémie) et l'augmentation du volume folliculaire (pour revue, Tsafriri & Reich, 1999). Le pic de LH induit aussi une cascade d'activations d'enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice extracellulaire (et notamment du collagène) nécessaire à la rupture du follicule (pour revue, Tsafriri & Reich, 1999). Lors de cette rupture, la pression intrafolliculaire induite par la présence du liquide folliculaire diminue brutalement, expulsant l'ovocyte entouré d'une partie des cellules du cumulus qui se dissocient, ne laissant autour de la cellule germinale que les cellules qui avaient établi des jonctions à travers la zone pellucide. Cette assise cellulaire réduite, qui porte le nom de *corona radiata*, est persistante chez la ratte, la souris et la femme mais très vite éliminée chez les ruminants. Le reste du follicule (figure 18 B), dépourvu de sa cellule germinale, entre alors en phase de lutéinisation. Il se remodèle rapidement, développe sa vascularisation et commence à produire de la progestérone, hormone essentielle à la gestation. Cette nouvelle structure prend le nom de corps jaune (ou *corpus luteum*). Le corps jaune est également capable de produire des

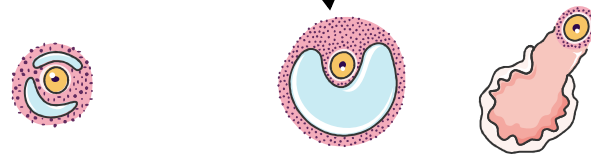
A : Régulateurs hypothalamiques



B : Hormones hypophysaires



Stades folliculaires



C : Hormones ovariennes

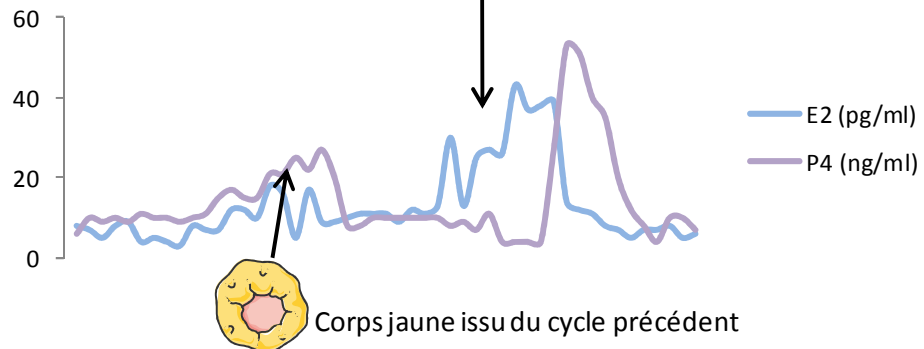


Figure 19 : Régulation de la croissance folliculaire.

A : Les neurones à GnRH ont une activité sécrétrice pulsatile intrinsèque modulée par les neurones à Kiss du PVAV et de l'ARC grâce à la présence de récepteurs.

B : Les taux circulants d'hormones de LH et FSH sont stables au cours du cycle, excepté en fin de pro-œstrus et œstrus où leurs concentrations augmentent brusquement. Le premier pic de FSH achève la croissance folliculaire, pic de LH déclenche l'ovulation et le second pic de FSH opère la sélection des follicules en croissance pour le cycle suivant. La durée de développement des follicules supérieure à celle d'un cycle implique que le follicule ovulé à un cycle a été recruté bien avant et que sa croissance terminale a lieu pendant la dégénérescence des corps jaunes issus du cycle précédent. Concentrations de FSH en ng/ml divisé par 10

C : Le taux de E2 est corrélé au développement des follicules en croissance tandis que le taux de P4 varie avec l'évolution du corps jaune du cycle précédent.

D'après Visser & Themmen, 2005, d'Anglemont de Tassigny & Colledge, 2010, Becker *et al.*, 2005, Fillingim & Ness, 2000

œstrogènes. Il régresse en 2 à 3 jours chez la ratte et 2 semaines chez la femme sous l'influence de facteurs endocrines (notamment les œstrogènes). Sa sécrétion de progestérone diminue, ses cellules entrent en apoptose et il devient le corps blanc (ou *corpus albicans*), un tissu fibreux avasculaire (pour revue Stocco *et al.*, 2007).

C. L'ovaire endocrine et sa place dans la régulation de la fonction de reproduction

i. *L'ovaire régulé par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique*

Le développement folliculaire est donc sous la dépendance de facteurs endocrines hypophysaires (FSH et LH) eux-mêmes régulés par des facteurs hypothalamiques.

- Régulateurs hypothalamiques

Le premier acteur de la régulation centrale de l'axe HHG est le système kiss (figure 19 A). Les deux populations distinctes de neurones à kiss sont toutes deux impliquées dans la régulation de la sécrétion de GnRH mais leur fonction est légèrement différente : alors que les neurones du PVAV sont chargées de générer les fortes décharges préovulatoires de GnRH, les neurones de l'ARC ont un rôle modulateur de la pulsativité. Donc les importantes décharges de GnRH induisant le pic de LH à l'origine de l'ovulation se produisent quand l'activité du PVAV est maximale et l'activité de l'ARC est minimale. A l'inverse, un faible taux de gonadotropines résulte d'une activité minimale dans le PVAV mais maximale dans l'ARC induisant des pulses de GnRH de plus faibles fréquence et amplitude (pour revue, Franceschini & Desroziers, 2013). La GnRH est une neurohormone peptidique dont la sécrétion pulsatile résulte des propriétés intrinsèques des neurones. En effet, leur culture *in vitro* en l'absence de tout autre facteur hormonal n'obère pas leur capacité sécrétrice régulière. Le relargage serait dû à la propagation le long de la fibre nerveuse d'un potentiel d'action spontané (impliquant les canaux sodiques) en présence de calcium (Martinez de la Escalera *et al.*, 1992). La sécrétion globale de GnRH étant la somme des sécrétions de chaque fibre, la coordination de ces fibres est indispensable. Elle serait assurée par des facteurs locaux diffusibles et peut-être directement par la GnRH elle-même par une boucle de rétrocontrôle ultra-courte (Martinez de la Escalera *et al.*, 1992). Les neurones à GnRH ne sont pas localisés dans une structure anatomiquement bien définie, ils sont diffus mais convergent vers une zone de l'hypothalamus nommée éminence médiane, d'où leurs sécrétions peuvent être acheminées vers l'hypophyse via le système porte hypophysaire (Silverman *et al.*, 1987). Les cibles de ces sécrétions sont les cellules gonadotropes, portant les récepteurs de la GnRH et situées dans l'hypophyse antérieure (Hopkins & Gregory, 1977).

- Hormones hypophysaires

Sous l'impulsion de la GnRH, les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure produisent deux types de gonadotropines (figure 19 B), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), dont la sécrétion est favorisée respectivement par les pulses de GnRH lents et rapides (pour

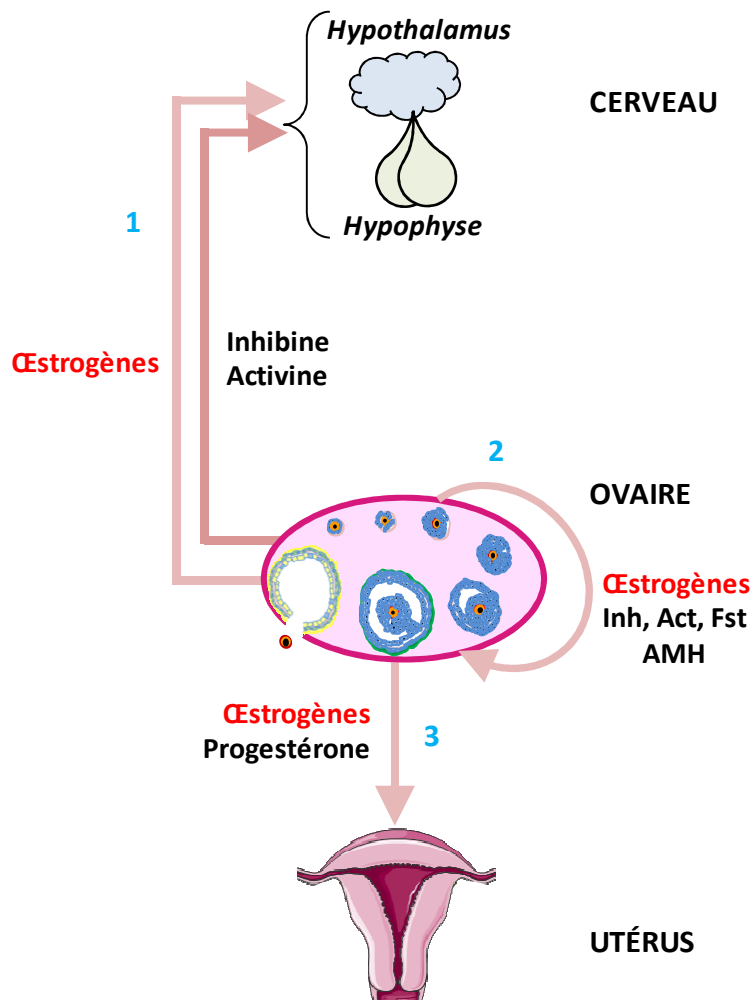


Figure 20 : Les 3 niveaux de régulations exercés par l'ovaire

1 : régulation ascendante

2 : régulation horizontale

3 : régulation descendante

Fst : follistatine

Act : activine

Inh : inhibine

Les œstrogènes interviennent à tous les niveaux de régulation.

revue, Shupnik, 1996). Les gonadotropines sont des glycoprotéines agissant en dimères. Les dimères sont composés d'une sous-unité α et une sous-unité β . FSH et LH partagent la même sous-unité α mais les β sont spécifiques. La transcription de la sous-unité α ne varie pas au cours du cycle. En revanche les transcriptions respectives de LH- β et FSH- β varient et sont au plus haut respectivement aux soirs du pro-œstrus et de l'œstrus. La transcription de chacun des gènes codant pour les trois sous-unités est sous la dépendance de la GnRH (et de sa pulsatilité) mais est modulée par les hormones ovariennes (pour revue, Marshall *et al.*, 1993). FSH et LH sont toutes deux libérées dans la circulation sanguine systémique pour atteindre leurs cibles : les ovaires.

1) La FSH

La FSH agit via ses récepteurs localisés sur les cellules de la granulosa, dont elle permet la multiplication et la différenciation au cours de la croissance folliculaire. La FSH est également impliquée dans la survie folliculaire, notamment en activant (toujours dans les cellules de la granulosa) la voie Pi3K et l'expression de Foxo3a (Matsuda *et al.*, 2012). Elle est nécessaire à la poursuite du développement folliculaire après le stade antral (Kumar *et al.*, 1997). Son second rôle est de stimuler la biosynthèse des œstrogènes.

2) La LH

Dans l'ovaire, les récepteurs de la LH sont portés majoritairement par les cellules de la thèque mais aussi par les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires. La LH y stimule la biosynthèse des œstrogènes et déclenche l'ovulation. Cependant elle a aussi un rôle majeur dans la production hormonale ovarienne juste après l'ovulation. En effet, le corps jaune produit alors sous sa dépendance une hormone spécifique nécessaire à l'établissement de la gestation : la progestérone. Chez des souris dont le gène de la LH a été invalidé, les ovaires ont une taille réduite et le développement folliculaire s'arrête au stade « petit antral » (Zhang *et al.*, 2001).

ii. Les hormones ovariennes

Les hormones ovariennes sont sécrétées (sous la dépendance des gonadotropines) par les follicules, structures évolutives au cours du cycle. Leur taux plasmatique est donc corrélé à l'état d'avancement du cycle (figure 19 C).

L'ovaire a un rôle de fournisseur de gamètes et un triple rôle régulateur (illustré en figure 20) qui font de lui l'organe central de la reproduction féminine.

- Régulation ascendante : grâce à des rétrocontrôles et modulations endocrines exercées par les hormones qu'il produit lui-même, l'ovaire est capable de réguler ses propres centres de contrôle.
- Régulation horizontale : il produit également ses propres modulateurs paracrines, faisant intervenir les dialogues entre cellules germinales et somatiques et permettant aux follicules dont le développement est le plus avancé de contrôler le développement des autres.

- Régulation descendante : l'ovaire est aussi à l'origine de la régulation endocrine du cycle utérin, assurant la prolifération et la différenciation des cellules de l'endomètre en vue de la gestation mais assurant aussi sa régression en l'absence de fécondation.

Ces régulations sont partagées par de nombreuses espèces et les œstrogènes sont impliqués dans les trois niveaux de régulations ovariennes. Ces régulations varient et s'ajustent au cours du cycle.

1) Œstradiol (17 β -œstradiol, E2)

La biosynthèse de l'œstradiol, œstrogène produit par les follicules en croissance sous l'influence de la LH et de la FSH, sera détaillée dans la section II.3. Cette biosynthèse augmente à mesure que le follicule grossit, entre le stade pré-antral et l'ovulation. Après l'ovulation, il existe une autre source de production d'E2 : le corps jaune.

Régulation ascendante

En fonction des concentrations plasmatiques, les œstrogènes exercent des effets différents sur l'hypophyse et l'hypothalamus mais aussi l'utérus. Selon la phase du cycle, le rétrocontrôle est positif ou négatif. Ce rétrocontrôle s'exerce grâce à la présence de récepteurs des œstrogènes sur les neurones kiss ainsi que sur les neurones à GnRH (Radovick *et al.*, 2012; Skynner *et al.*, 1999).

Régulation descendante

L'utérus est également un tissu-cible des œstrogènes. L'endomètre, la zone en contact avec la lumière utérine, est un tissu muqueux qui prolifère durant le pro-œstrus sous l'influence des œstrogènes (pour revue, Groothuis *et al.*, 2007).

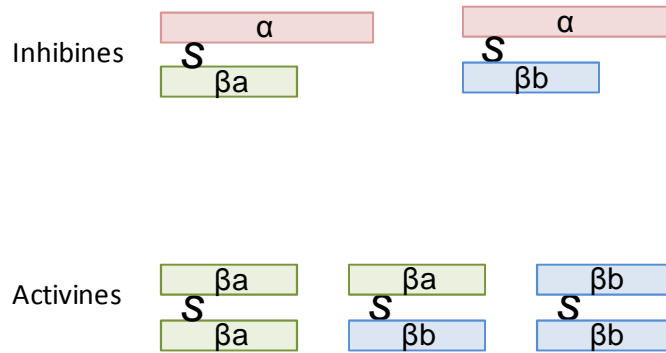
Régulation horizontale

Outre son action endocrine, l'œstradiol est aussi un régulateur paracrine indispensable à la croissance folliculaire (Goldenberg *et al.*, 1972). Il agit majoritairement sur les cellules de la granulosa qui portent ses récepteurs (Couse *et al.*, 2005). Il stimule leur prolifération et a des propriétés anti-apoptotiques, expliquant probablement que l'œstradiol est plus exprimé chez les follicules dominants que chez les subordonnés voués à l'atrésie. Il favorise aussi la différenciation des cellules de la granulosa induisant l'expression des récepteurs de la LH (pour revue, Quirk *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2012). Il est également un régulateur de l'expression des composants de la matrice extra-cellulaire et donc de la membrane basale (Zalewski *et al.*, 2012), structure dynamique subissant de nombreux changements pour accompagner la croissance du follicule et permettre l'ovulation.

2) Progestérone

La progestérone est l'hormone produite par le corps jaune formé par les cellules somatiques du follicule après ovulation.

A



B

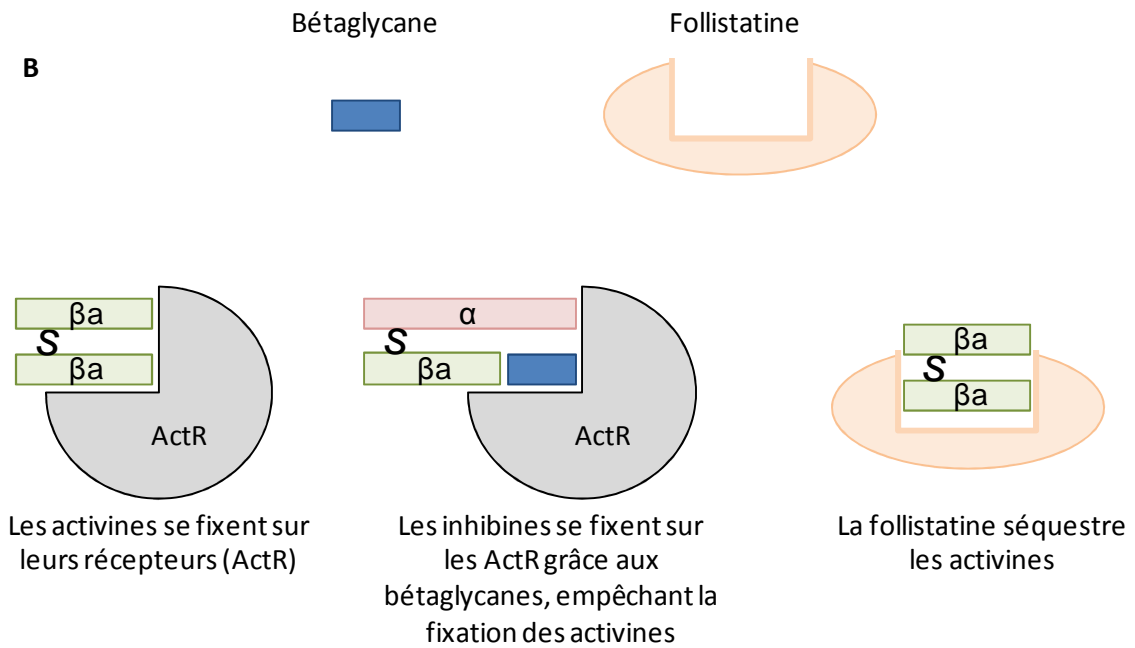


Figure 21: Inhibines, activines, follistatines.

A : Constitution des inhibines et activines

B : Mode d'action et régulation des activines

Références dans le texte.

Régulation ascendante

La présence de récepteurs de la progestérone sur les neurones à kiss (notamment dans l'ARC) permet à cette hormone d'exercer dessus un rétrocontrôle négatif (pour revue, d'Anglemont de Tassigny & Colledge, 2010).

Régulation descendante

Elle agit aussi de façon endocrine sur l'utérus. L'absence de progestérone empêche le développement de la muqueuse, la rendant inapte à la gestation (c'est le principe du RU486, puissant antagoniste de la progestérone, utilisé notamment comme contraceptif d'urgence ou comme abortif). En effet, l'endomètre acquiert des capacités sécrétrices en phase post-ovulatoire sous l'influence de la progestérone, lui conférant son aptitude à recevoir un embryon. Chez la femme, en fin de phase lutéale a lieu la nécrose des cellules endométriales superficielles, à l'origine des menstruations. Chez les rongeurs, l'endomètre régresse et est résorbé à la fin du diœstrus (pour revue, Groothuis *et al.*, 2007).

Régulation horizontale

Des récepteurs de la progestérone sont portés par les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires en réponse au pic de LH. Après invalidation de ces récepteurs par KO, les souris sont stériles, elles présentent un défaut d'ovulation (pour revue, Akison & Robker, 2012).

3) Inhibines, activines, follistatine

Les inhibines et activines sont des dimères glycoprotéiques. Leur expression est codée par 3 gènes différents dont dérivent 3 sous-unités (α , β_a et β_b) qui se combinent de façon spécifique grâce à un pont disulfure pour former soit de l'inhibine A (α - β_a) ou B (α - β_b), soit de l'activine A (β_a - β_a), B (β_b - β_b) ou AB (β_a - β_b) (pour revue, Knight & Glister, 2001) (voir figure 21). Les activines sont produites par les cellules de la granulosa entre les stades « primaire » et « pré-antral ». Les inhibines sont produites par les cellules de la granulosa dès le stade antral et leur expression augmente au stade pré-ovulatoire et dans le corps jaune (pour revue, Hillier, 1991; Knight *et al.*, 2012). La follistatine suit le même schéma d'expression que l'inhibine (pour revue, Lin *et al.*, 2003). Les inhibines et follistatines sont des modulateurs des activines. Les inhibines n'ont pas de récepteurs propres, elles agissent par antagonisme des activines en se fixant sur leurs récepteurs : les ActR (Lebrun & Vale, 1997) par l'intermédiaire des bétaglycanes (Lewis *et al.*, 2000). La follistatine agit en se fixant sur les activines, les empêchant ainsi d'activer leurs récepteurs.

Régulation ascendante :

Ces molécules ont tout d'abord été purifiées à partir de fluide gonadique et caractérisées par leur action modulatrice de la sécrétion de FSH par les cellules gonadotropes. En effet, les ActR sont exprimés par les cellules de la granulosa, de la thèque, de l'ovocyte mais aussi les cellules gonadotropes hypophysaires, où l'expression de la FSH- β est directement dépendante de la présence

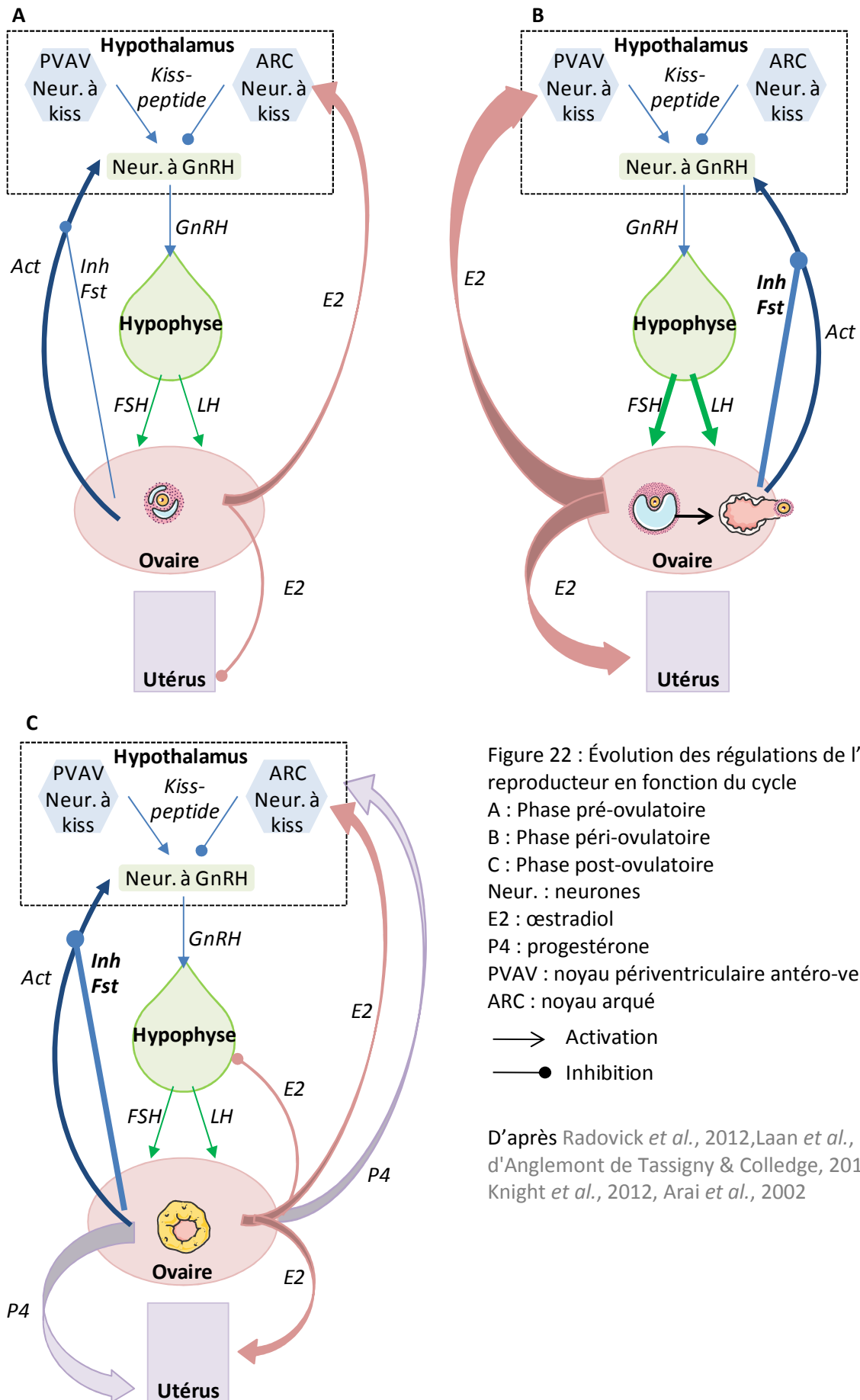


Figure 22 : Évolution des régulations de l'axe reproducteur en fonction du cycle

A : Phase pré-ovulatoire

B : Phase péri-ovulatoire

C : Phase post-ovulatoire

Neur. : neurones

E2 : œstradiol

P4 : progestérone

PVAV : noyau périventriculaire antéro-ventral

ARC : noyau arqué

→ Activation

● Inhibition

D'après Radovick *et al.*, 2012, Laan *et al.*, 2012
d'Anglemont de Tassigny & Colledge, 2010
Knight *et al.*, 2012, Arai *et al.*, 2002

des activines qui, agissant conjointement avec la GnRH, permettent la production de FSH (pour revue, Bilezikjian *et al.*, 2004).

Régulation horizontale :

Dans l'ovaire, les activines agissent comme un activateur autocrine de la folliculogénèse, particulièrement du stade primaire au stade préantral, stimulant la prolifération des cellules de la granulosa. Les activines produites par les cellules du cumulus peuvent ainsi agir sur la maturation de l'ovocyte, et notamment la reprise méiotique, afin de rendre l'ovocyte apte à la fécondation (pour revue, Knight *et al.*, 2012). Les inhibines auraient également un rôle paracrine de stimulation de la production hormonale des cellules de la thèque, expliquant en partie l'augmentation de la production d'œstrogènes chez les follicules les plus avancés dans leur développement (pour revue, Knight & Glister, 2001).

4) L'AMH

Dans l'ovaire adulte, l'Amh est produite par les cellules de la granulosa dès le stade primaire, lorsque les follicules entrent en croissance (comme évoqué dans la section « transition primo/primaire », page 43) et ses récepteurs sont portés par les cellules de la granulosa des follicules en croissance jusqu'au stade antral. Son expression décline progressivement jusqu'au stade de sélection folliculaire par la FSH. Après quoi elle n'est exprimée que par les follicules qui, n'ayant pas été sélectionnés, entrent en atresie. L'Amh a essentiellement un rôle paracrine. Elle a été montrée comme étant inhibitrice de l'aromatase (enzyme nécessaire à la production des œstrogènes) et facteur réducteur du nombre de récepteurs de la LH sur les cellules de la granulosa (pour revue, Visser & Themmen, 2005). Toutes ces observations sont cohérentes avec un « effet retard » sur le développement folliculaire.

5) Le Kiss-peptide ?

L'expression de kiss-peptide par l'ovaire a été détectée, ainsi que la présence de son récepteur, dans les cellules de la thèque des follicules en croissance et dans le corps jaune. L'expression du kiss-peptide varie au cours du cycle et présente un pic coïncidant avec le pic de LH à l'origine de l'ovulation. L'hypothèse d'une implication de ce système dans le déclenchement paracrine de l'ovulation a donc été avancée (Castellano *et al.*, 2006) mais les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus.

iii. Régulations globales de l'axe reproducteur en fonction du cycle

Selon le moment du cycle et les taux hormonaux circulants, les rétrocontrôles mis en place diffèrent.

Phase préovulatoire (figure 22 A)

Chez les ratte adultes ayant un cycle normal, la LH et la FSH sont sécrétées en faibles quantités au cours du metœstrus / diœstrus, mais suffisante pour stimuler la croissance d'une cohorte de follicules. Ces follicules immatures ne sécrètent que peu d'œstrogènes, ce qui induit la mise en place d'un rétrocontrôle négatif sur les neurones à kiss de l'ARC. Ce rétro-contrôle réduit la sécrétion de

GnRH, maintenant les taux de LH et FSH au plus bas. Le rapport activine / inhibine-follistatine est plutôt favorable aux activines, produites jusqu'au stade pré-antral. Le faible taux d'œstrogènes induit dans l'utérus la régression puis la résorption de l'endomètre.

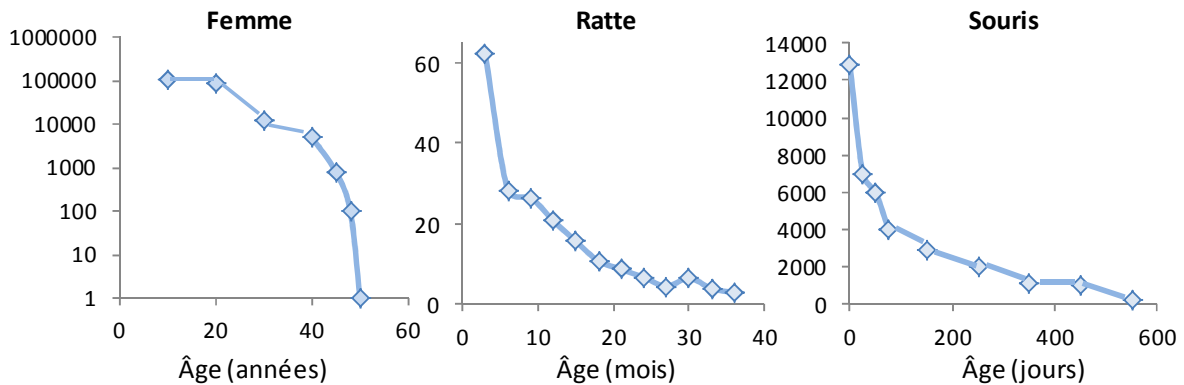
Phase périovulatoire (figure 22 B)

La synthèse des œstrogènes est stimulée dans les follicules ovariens par les gonadotropines. Le rapport activine / inhibine-follistatine devient défavorable aux activines grâce à une hausse de production de Fst (Inh et Fst sont produites majoritairement par les follicules après le stade antral). Les taux circulants d'œstradiol (dont la production est stimulée par les inhibines dans les follicules en fin de croissance) augmentent à mesure que le cycle avance pour former un pic le soir du pro-œstrus. Cette importante augmentation du taux d'œstradiol enclenche un rétrocontrôle positif (Wang & Yen, 1975) sur l'hypothalamus et notamment les neurones à kiss du PVAV, ce qui induit l'augmentation de la sécrétion de la GnRH qui à son tour déclenche le pic sécrétoire de LH hypothalamique. Dans l'ovaire, ce pic de LH provoque l'ovulation. La mise en place du rétrocontrôle positif exercé par les œstrogènes en phase de croissance folliculaire dépend de plusieurs éléments : les taux circulants d'œstradiol doivent être très élevés, ce qui induit l'apparition de récepteurs de la progestérone dans l'hypothalamus. Les taux relativement élevés de progestérone circulante avant l'ovulation sont également nécessaires au déclenchement du pic de LH (Hibbert *et al.*, 1996). Cette progestérone serait en partie produite par les astrocytes, cellules du cerveau, suite à l'élévation du taux d'œstrogènes (Micevych & Sinchak, 2008). Un pic d'inhibine se produit juste après le pic de gonadotropines, contribuant à en réduire les taux circulants. Dans l'utérus, les taux élevés d'œstrogènes induisent la prolifération des cellules endométriales.

Phase postovulatoire (figure 22 C)

Après l'ovulation, la LH stimule la maturation du corps jaune qui sécrète alors des œstrogènes mais en plus faible quantité que le follicule mature. Ces œstrogènes induisent alors à nouveau un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus, ralentissant la production de GnRH et donc de LH et FSH (Welt *et al.*, 2003), aidés par la hausse de la production de Fst, produite en grande quantité par le corps jaune. Les inhibines sont également déterminantes à cette phase du cycle pour établir le rétrocontrôle négatif (Welt *et al.*, 2003). Le corps jaune sécrète aussi de la progestérone qui renforce encore le rétrocontrôle négatif exercé sur l'hypothalamus grâce à la présence de ses récepteurs sur les neurones à kiss (Roa *et al.*, 2008). Parallèlement la progestérone induit la maturation de l'endomètre.

A : Evolution du nombre de follicules



B : Vie reproductive

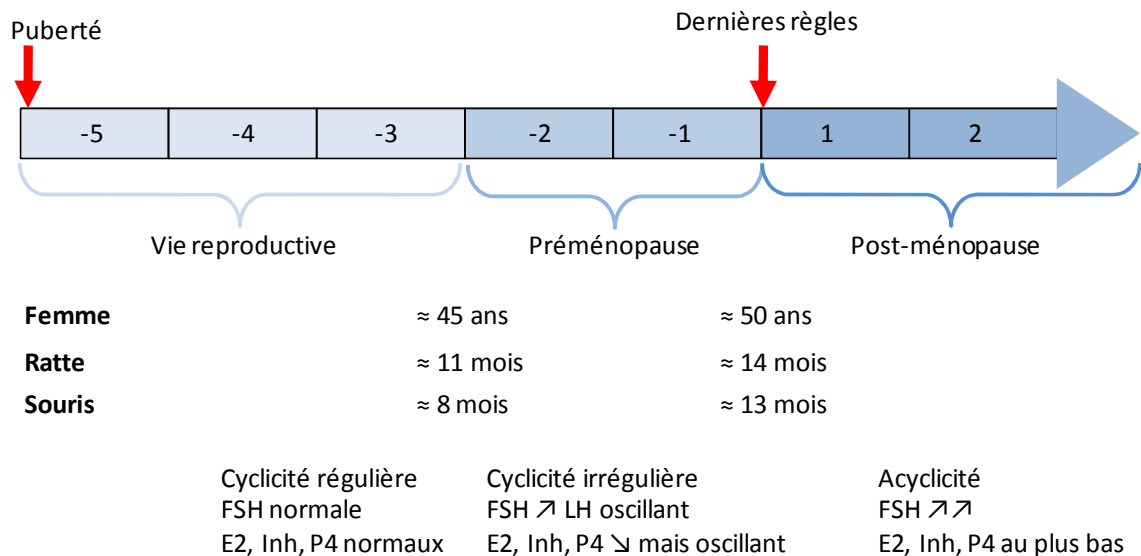


Figure 23 : Vie reproductive et vieillissement

A : Déclin de la réserve folliculaire au cours du temps chez la femme (follicules par ovaire), chez la ratte F344N (follicules par coupe histologique d'ovaire), chez la souris CD1 (follicules totaux). Les 3 espèces présentent un important déclin de la réserve ovocytaire avec l'âge.

Nota: Les rats F344N ont été sélectionnés pour leur durée de vie très longue (environ 38 mois contre 22 pour un rat Sprague-Dawley). D'après Jones & Krohn, 1961; Nishijima *et al.*, 2013.

B : Classification par stades de la vie reproductive. Les âges moyens de survenue de ces stades sont indiqués pour la femme et la ratte. Les modifications physiologiques de cyclicité et d'endocrinologie sont similaires chez ces deux espèces.

Pour revue, Butler & Santoro, 2011; Nelson *et al.*, 1981.

D. Sénescence reproductive

Chez de nombreuses espèces (primates, rongeurs...), les capacités reproductives diminuent avec l'âge. Cette diminution est liée à des modifications ovariennes (épuisement de la réserve folliculaire), des modifications centrales (altération du système GnRH) et des modifications utérines (altération de son contenu en collagène). Alors que chez la femme, l'organe limitant les capacités reproductives est l'ovaire et le déclin de sa réserve folliculaire, chez la ratte l'ovaire continue à produire des ovocytes « fonctionnels » jusqu'à un âge avancé et l'organe limitant est l'utérus (Finn, 1962). À partir de la puberté, l'évolution de la vie reproductive a été décrite en 7 stades (de -5 à 2) issus du *Stages of Reproductive Aging Workshop* qui s'est tenu en 2001 (Soules *et al.*, 2001) et présentés en figure 23 B.

Vie reproductive (stades -5 ; -4 ; -3)

La réserve folliculaire, malgré son déclin progressif (figure 23 A) tant chez la femme que chez les rongeurs, fournit des follicules sains contenant un ovocyte apte à la fécondation. L'utérus, répondant à la stimulation ovarienne, est capable de soutenir le développement des embryons. Les cycles sont réguliers et les rétrocontrôles sont en place. Vers 38 ans chez la femme, le déclin de la réserve folliculaire s'accélère (Richardson *et al.*, 1987).

Préménopause (stades -2 ; -1)

Dans l'ovaire, le nombre de follicules diminue et parmi eux, la proportion d'ovocytes de mauvaise qualité augmente, notamment porteurs d'anomalies méiotiques (pour revue, Broekmans *et al.*, 2009). Henderson & Edwards (Henderson & Edwards, 1968) rapportent dès la fin des années 60 que plus l'âge d'une souris augmente, moins ses ovocytes portent de chiasmas, ces points de liaisons des chromatides permettant des échanges de chromatine lors du stade pachytène de prophase I (pour rappel, voir figure 5, page 20). Ceci est à mettre en parallèle avec l'augmentation du risque d'anomalies génétiques chez les petits issus de ces mères âgées. Les cohortes de follicules étant moins importantes, les taux d'œstrogènes et d'inhibine qu'ils produisent diminuent. Ceci a pour effet de lever le rétrocontrôle négatif exercé par les œstrogènes sur l'hypothalamus (Matt *et al.*, 1993) et conduit à l'élévation des taux circulants de FSH, chez la femme comme chez la ratte (pour revue, Wise, 1999). L'utérus, sous la dépendance des œstrogènes et de la progestérone dont la quantité diminue, perd progressivement son aptitude à maintenir une gestation. L'utérus vieillissant se modifie et la quantité de collagène qu'il contient augmente considérablement, tant chez la ratte (Schaub, 1964) que chez la femme (Woessner, 1963). Parallèlement, le déclin des taux circulants d'œstrogènes et de progestérone qui gouvernent ses capacités prolifératives entraîne une atrophie progressive des tissus utérins (Finn, 1962). Ces deux facteurs réduisent sa capacité à supporter une gestation. La combinaison entre cet état utérin et la qualité moindre des ovocytes disponibles conduit à l'augmentation de la survenue d'avortement spontané chez la femme (pour revue, Ubaldi *et al.*, 2003) et chez la ratte (Matt *et al.*, 1986). Parallèlement, l'activité des neurones à GnRH se modifie, indiquant une origine centrale de la survenue de la ménopause (pour revue, Wise, 1999) de la même façon que le déclenchement de la puberté est partiellement induit par des modifications

Sénescence normale	Gonadotropines : FSH ↗↗, LH ↗↗(femme / primate), LH ↘ (ratte) Hormones ovariennes : E2 ↘↘, Inh ↘↘, AMH ↘↘, P4 ↘↘, Testo ↘
Sénescence précoce (IOP)	Gonadotropines : FSH ↗↗, LH ↗↗ (femme), LH↘ (ratte) Hormones ovariennes : E2 ↘↘ , Inh ↘↘, AMH ↘↘, P4↘↘, Testo ↘
SOPK	Gonadotropines : FSH = ou ↘, LH ↗↗ Hormones ovariennes : E2 = , Inh = ou ↗, AMH ↗↗, P4 ↘↘, Testo ↗↗

Tableau 2 : Comparaison des profils hormonaux dans le cadre de la sénescence normale, la sénescence précoce ou le SOPK.

= : inchangé

↘ : en baisse

↗ : en hausse

La sénescence normale est caractérisée chez la femme (et les primates) par une élévation des hormones hypophysaires et une diminution des hormones ovariennes. Chez les rongeurs en revanche, la LH est réduite.

Le SOPK est caractérisé par une élévation du taux de LH. Parmi les hormones ovariennes, le taux d'œstradiol est normal, ainsi que l'inhibine (normale ou légèrement augmentée). L'AMH est très élevée, ainsi que la testostérone, mais la progestérone est très basse.

D'après Shin *et al.*, 2008, Mazaud *et al.*, 2002, Dewailly *et al.*, 2011, Woller *et al.*, 2002, Visser JA, 2012, Marik & Hulka, 1978, Cooper *et al.*, 1980, Pigny *et al.*, 1997, Ambler *et al.*, 2012.

centrales indépendantes des modifications survenant dans l'ovaire. Les cycles deviennent irréguliers (plus courts chez la femme (Treloar *et al.*, 1967), plus longs chez la souris (Nelson *et al.*, 1981) et la ratte) et en partie anovulatoires. L'absence de corps jaune renforce alors la levée de rétrocontrôle négatif exercé sur l'hypothalamus (pour revue, Broekmans *et al.*, 2009). La stérilité survient donc environ 5 ans avant la ménopause, qui est la dernière période de règles survenant chez la femme. Il n'y a donc pas de ménopause définie comme telle chez les rongeurs mais ceux-ci entrent d'abord en œstrus permanent signant l'entrée proche en état définitif d'anoestrus (Felicio *et al.*, 1984).

Post-ménopause (stades 1 ; 2)

La cyclicité est complètement suspendue. En l'absence des rétrocontrôles, le taux de FSH continue à augmenter. Si chez la femme ou la femelle macaque la LH augmente (Shin *et al.*, 2008; Woller *et al.*, 2002), elle diminue chez la ratte (Cooper *et al.*, 1980) suggérant des mécanismes différents qui conduisent cependant aux mêmes troubles. Il est possible de rencontrer encore quelques rares follicules entrant en développement au stade 1 chez la femme mais ils deviennent rapidement atrétiques (Costoff & Mahesh, 1975). Les taux d'œstrogènes, inhibine et progestérone sont alors au plus bas, tant chez la femme (pour revue, Butler & Santoro, 2011) que la ratte (Nelson *et al.*, 1981).

E. Pathologies de l'ovaire adulte

Certaines pathologies affectent les ovaires et influencent les capacités reproductrices, conduisant à des difficultés à concevoir, une infertilité secondaire (infertilité déclarée après une période fertile) voire une infertilité primaire (absence de période fertile).

- L'insuffisance ovarienne précoce (IOP) est caractérisée par un épuisement précoce de la réserve folliculaire, une aménorrhée, une élévation du taux de FSH et de LH et un déclin de E2, comme la ménopause décrite précédemment mais survenant avant l'âge de 40 ans. Le tableau 2 compare les profils hormonaux chez la femme et la ratte en cas de sénescence ovarienne normale et IOP. Sa prévalence serait d'environ 1 % (pour revue, Okeke *et al.*, 2013). Elle peut survenir à cause d'un défaut génétique (syndrome de l'X fragile, syndrome de Turner, mutation sur des récepteurs d'hormones impliquées dans la régulation de l'axe reproducteur, sur des gènes responsables de l'expression de facteurs régulant le recrutement folliculaire), d'une maladie auto-immune ou encore de l'exposition à un traitement anti-cancéreux ayant artificiellement entraîné la déplétion du stock ovocytaire (pour revue, De Vos *et al.*, 2010; Beck-Peccoz & Persani, 2006). L'apparition « spontanée » de ces IOP serait en augmentation. Le traitement par des œstrogènes de femmes diagnostiquées porteuses de IOP rétablit des taux de gonadotropines normaux et peut restaurer la fertilité (Popat *et al.*, 2008; Alper *et al.*, 1986; Kreiner *et al.*, 1988) suggérant que la défaillance est due à la déplétion du stock ovocytaire et non à des mécanismes centraux ou un vieillissement de l'utérus.

Des modèles expérimentaux reproduisent l'IOP. Par exemple, les rattes irradiées *in utero* ont un stock ovocytaire réduit conduisant à une baisse de la fécondité dès l'âge de 4 mois. Leur profil hormonal est le même que celui des rattes âgées en phase de sénescence normale (Mazaud *et al.*, 2002). Le modèle historique de l'IOP est l'ovariectomie unilatérale. Les rattes qui y sont soumises

mettent en place un mécanisme compensatoire qui épuise rapidement le stock d'ovocytes disponible dans l'ovaire restant (Butcher, 1985). Les manipulations génétiques de souris ont également conduit à la génération de modèles reproduisant l'IOP. Ainsi les souris KO pour le gène de l'AMH, facteur limitant la sortie de l'état de quiescence folliculaire avant l'entrée en croissance, épuisent leur stock de follicules plus rapidement que les animaux témoins (Durlinger *et al.*, 1999). L'invalidation du gène de la follistatine dans les cellules de la granulosa conduit également à une réduction anticipée des capacités de reproduction et le profil hormonal est semblable à celui d'une IOP (à l'exception de l'Amh, non mesurée) (Jorgez *et al.*, 2004). L'invalidation spécifique du gène de ER α sur les cellules de la thèque induit également l'augmentation de la FSH circulante, des troubles de la cyclicité avant 6 mois mais une capacité de restauration de fertilité (par des gonadotropines exogènes) comme dans le cadre d'une IOP (Lee *et al.*, 2009). Enfin, la double invalidation de 2 gènes de glycosyltransférases (impliquées dans les modifications protéiques post-traductionnelles) conduit à une infertilité secondaire dès l'âge de 3 mois et un profil hormonal concordant avec une IOP (Williams & Stanley, 2011). Par ailleurs, les modèles d'invalidation de gènes clés pour la migration des cellules germinales primordiales, la survie ovocytaire ou encore la méiose (qui ont été évoqués dans les parties I.1 et I.2) peuvent potentiellement être utilisés mais leurs profils hormonaux doivent être étudiés.

- Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a été décrit en 1935 par Stein et Leventhal (Stein, 1935). Il semble toucher plus de 10 % des femmes en âge de procréer bien que sa prévalence soit difficile à estimer à cause de la complexité de son tableau clinique. En effet, le SOPK est généralement associé à des troubles métaboliques (obésité, résistance à l'insuline) mais surtout à des troubles de la fonction de reproduction : hyperandrogénisme, perturbations de l'ovulation et du cycle menstruel, des taux de E2 et FSH normaux (voire légèrement diminué) mais LH au contraire très élevée ainsi que l'AMH (tableau 2) et un nombre de follicules antraux anormalement élevé (> 19, critère échographique) (pour revue, Dewailly *et al.*, 2011), ce qui est paradoxal puisque l'Amh est habituellement décrit comme un facteur de quiescence folliculaire. Cependant, tous ces symptômes peuvent ne pas être présents en même temps chez une femme souffrant de SOPK. Les symptômes majeurs actuellement pris en compte dans le diagnostic de cette pathologie sont les troubles de l'ovulation, l'hyperandrogénisme, la proportion de follicules antraux et le taux sérique d'Amh. Les cellules de la granulosa expriment précocement les récepteurs de la LH et l'inhibine, biaisant la sélection de l'unique follicule dominant qui ne semble pas s'établir chez les femmes atteintes de cette pathologie. L'absence de pic de LH empêche l'ovulation (Lockwood *et al.*, 1998). Les cellules de la thèque ont un fonctionnement altéré, augmentant leur production d'androgènes.

Les mécanismes mis en jeu dans ce syndrome sont encore largement incompris. L'origine de ce syndrome est mal connue mais afin de l'étudier, des modèles animaux ont été générés. La femelle macaque traitée *in utero* avec de la testostérone avant le milieu de la gestation présente un SOPK (Abbott *et al.*, 2013). Le traitement prénatal de moutons Suffolk entre 30 et 90 jours de gestation à l'aide de testostérone reproduit également beaucoup des caractéristiques du SOPK (pour revue, Padmanabhan & Veiga-Lopez, 2013). Le traitement de cobayes adultes par des œstrogènes (E2, fortement suspecté d'induire des SOPK) est également efficace (Quandt & Hutz, 1993). Chez la ratte

adulte, des traitements de 4 et 21 jours à l'aide respectivement de letrozole (inhibiteur de l'aromatase) ou RU486 (antagoniste de la progestérone) induisent également un syndrome similaire. L'E2 a également été testé mais son action sur le taux de LH et d'androgènes (deux critères majeurs) était incertaine (pour revue, Walters *et al.*, 2012).

II. Les œstrogènes

1. LE RÔLE DES ŒSTROGÈNES DANS DIFFÉRENTES FONCTIONS

Les œstrogènes sont impliqués dans la régulation de la sécrétion des hormones de l'axe HHG, y compris leur propre sécrétion, et contrôlent également les cycles ovarien et utérin. Ils sont aussi responsables de l'apparition des caractères sexuels secondaires féminins aux alentours de la puberté. Plus tard, ils participent à la progression du travail et la parturition en stimulant la réaction inflammatoire mise en place lors de la naissance et en augmentant la contractilité du myomètre (pour revue, Williams *et al.*, 2012).

Mais le système reproducteur n'est pas la seule cible des œstrogènes. Ils sont en effet impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques. Ils sont par exemple indispensables pour le développement et le maintien osseux et ce dans les deux sexes (Riggs *et al.*, 2002). Ils sont bénéfiques pour le développement des muscles (Lowe *et al.*, 2010) et ont un rôle protecteur pour la fonction immunitaire et la récupération cardio-vasculaire après un traumatisme (pour revue, Choudhry & Chaudry, 2008). Ils ont un effet athéroprotecteur (Darblade *et al.*, 2002), stimulent la réponse immunitaire humorale (Cutolo *et al.*, 2006) et ont un effet protecteur contre la maladie d'Alzheimer (pour revue, Stahelin, 1999). Enfin, ils diminuent la lipogenèse et l'apport alimentaire par un contrôle nerveux central sur la sensation de satiété (Green *et al.*, 1992; pour revue, Butera, 2010).

2. LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

A. Découverte et structure

En injectant de l'œstradiol radioactif à des rattes immatures, Noteboom & Gorski démontrent en 1965 sa fixation préférentielle sur des tissus-cibles tels que l'utérus, le vagin et l'hypophyse antérieure (Noteboom & Gorski, 1965). Ils émettent alors l'hypothèse de la présence de sites spécifiques permettant la liaison de l'œstradiol sur ces organes. Ce site de liaison est caractérisé l'année suivante (Toft & Gorski, 1966). Il s'agit en fait du récepteur Er α (aussi appelé ESR1 ou Nr3A1). Un second récepteur, Er β (ou ESR2, Nr3A2), est identifié et caractérisé en 1996 (Kuiper *et al.*, 1996). Ces deux récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, agissant comme des facteurs de transcription ligand-dépendant (pour revue, MacGregor & Jordan, 1998). Ils possèdent

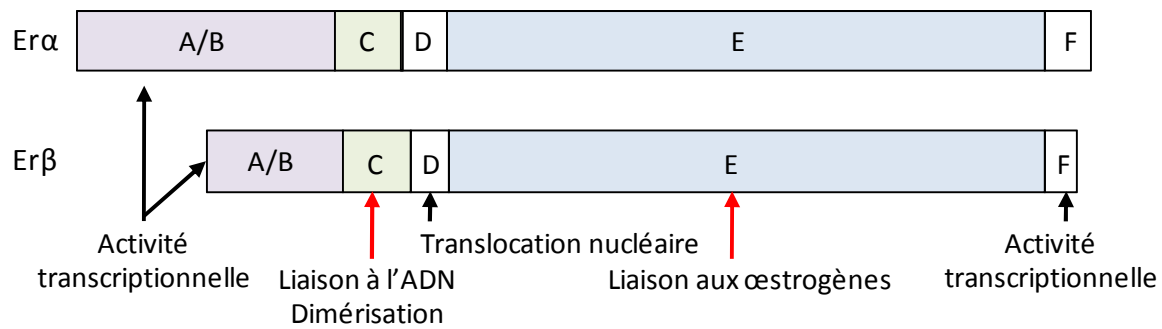


Figure 24: Structures comparées des récepteurs des œstrogènes.

Avec plus de 90 % d'homologie au sein d'une même espèce, le domaine C, assurant la liaison à l'ADN, est le plus conservé. Le domaine de liaison au ligand (E) est quant à lui similaire à 60 %.

D'après Krust *et al.*, 1986, Kumar *et al.*, 1986, Kuiper *et al.*, 1996, Pace *et al.*, 1997.

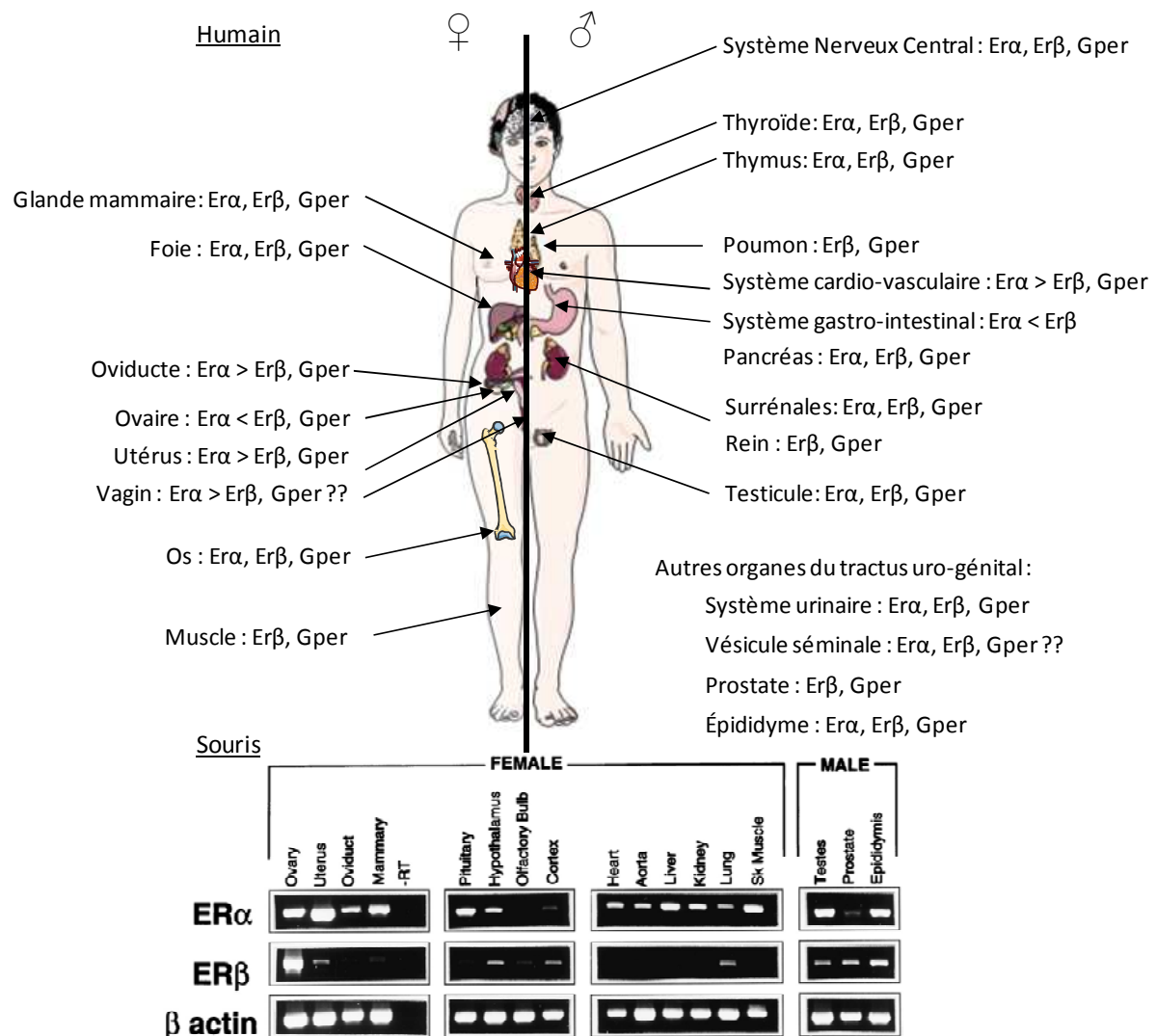


Figure 25 : Distribution tissulaire des récepteurs des œstrogènes.

Cette distribution est très conservée entre les espèces. Les récepteurs des œstrogènes sont exprimés dans de nombreux tissus, chez l'homme comme chez la femme, permettant l'influence de ces hormones sur de nombreuses fonctions.

D'après : Jacobs *et al.*, 2003, Gustafsson, 1999, Saunders *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2008a, Rajoria *et al.*, 2011, Vivacqua *et al.*, 2006, Nadal *et al.*, 2011, Velders *et al.*, 2012, Mowa & Iwanaga, 2000, Samartzis *et al.*, 2012, Wen *et al.*, 2012, Chavalmene *et al.*, 2010, Baquedano *et al.*, 2007, Pang *et al.*, 2008, Carreau *et al.*, 2011, Couse & Korach, 1999.

des structures assez proches, découpées en 6 domaines selon leur fonction (figure 24). Ces structures sont très conservées entre les espèces. Les domaines A/B sont impliqués dans les transactivations non ligand-dépendantes par liaison avec des co-activateurs ou co-répresseurs. Le domaine C a pour fonction de permettre la dimérisation des récepteurs et aussi de se lier à l'ADN. Ce domaine C est le plus conservé entre les deux types de récepteurs, à la fois au sein d'une même espèce et entre des espèces différentes. La fonction du domaine D est encore mal connue mais il serait impliqué dans la translocation nucléaire. Quant aux domaines E/F, ils assurent la liaison au ligand (les œstrogènes endogènes mais aussi d'autres substances exogènes) et la transactivation ligand-dépendante (pour revue, Roman-Blas *et al.*, 2009). Ces deux récepteurs présentent chacun plusieurs isoformes chez l'homme : au moins 6 pour Er α (Flouriot *et al.*, 2000) et au moins 5 pour Er β (Younes & Honma, 2011). Outre ces récepteurs nucléaires, un récepteur membranaire a été décrit : Gper (ou GPR30). Il s'agit d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine G ayant une forte affinité pour les œstrogènes (pour revue, Nilsson *et al.*, 2011a).

La distribution tissulaire de ces 3 types de récepteurs des œstrogènes est présentée sur la figure 25. L'homme comme la femme portent ces récepteurs dans de nombreux organes, expliquant que les œstrogènes aient un impact sur de nombreuses fonctions. Ils ne sont pas exprimés de façon égale dans tous les organes : le tractus génital féminin est très riche, expliquant l'action préférentielle des œstrogènes sur ces tissus. De même, la répartition des récepteurs varie selon le tissu : l'oviducte et l'utérus contiennent plus de Er α que Er β alors que c'est l'inverse dans l'ovaire. Dans cet organe, les cellules de la thèque expriment préférentiellement Er α alors que les cellules de la granulosa expriment plutôt Er β (Fitzpatrick *et al.*, 1999). ER α et β s'expriment dans l'ovaire de souris dès 1 jpn (Jefferson *et al.*, 2000) et peuvent donc fixer les œstrogènes. ER β est la forme prédominante dans l'ovaire, tant chez l'animal immature que chez l'adulte. ER β est très exprimé par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (Byers *et al.*, 1997). Le corps jaune, dès sa formation, passe d'une prédominance de ER β à ER α (Stocco *et al.*, 2007). Les récepteurs des œstrogènes sont également exprimés dans l'hypothalamus par les neurones à kiss (Radovick *et al.*, 2012) et les neurones à GnRH (Skynner *et al.*, 1999). Il semblerait que ER α soit le récepteur essentiel aux rétro-contrôles exercés par les œstrogènes (Couse *et al.*, 2003, Glidewell-Kenney *et al.*, 2007).

Kliwer *et al.* décrivent en 1998 un nouveau récepteur nucléaire impliqué dans les voies de signalisation des stéroïdes (Kliwer *et al.*, 1998). Ce nouveau récepteur est nommé Pregnane X Receptor (PXR) et entre dans la nomenclature des récepteurs nucléaires sous le nom de Nr1i2. En 2007, Mnif *et al.* démontrent qu'il a pour ligand plusieurs œstrogènes (notamment l'œstrone E1 et le 17 β -œstradiol E2) (Mnif *et al.*, 2007).

Les Estrogen-Related Receptors (α et β) sont isolés en 1988 (Giguere *et al.*, 1988). Un troisième type (ERR γ) est isolé en 1999 (Hong *et al.*, 1999). Leur structure s'approche de celle des ER classiques mais le degré d'homologie de séquence est variable selon le domaine considéré. Avec près de 70 % d'homologie entre ER et ERR, le domaine de liaison à l'ADN est le plus conservé. Mais ces récepteurs

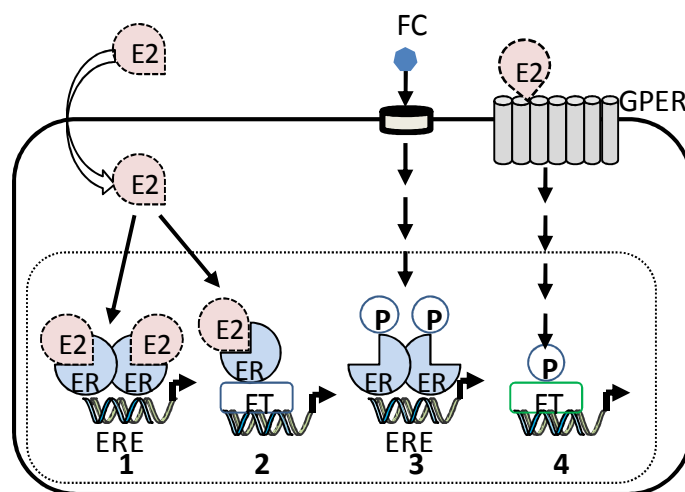


Figure 26 : Modes d'action et voies de signalisation des œstrogènes.

1 : Voie génomique classique. Les œstrogènes, liposolubles, pénètrent dans la cellule de façon passive. Ils se lient aux récepteurs. Après dimérisation, le complexe se lie à son tour aux Estrogen Response Elements (ERE) localisés dans le promoteur du gène cible.

2 : Voie indépendante des ERE. Le complexe E2 – récepteur interagit avec des Facteurs de Transcription (FT) qui se fixent sur le promoteur du gène cible.

3 : Voie indépendante du ligand. Sans E2, les ER sont phosphorylés (P) par une cascade de réactions déclenchée par des Facteurs de Croissance (FC) et vont se fixer sur les ERE.

4 : E2 active le récepteur membranaire GPER et déclenche une cascade de phosphorylations interférant avec des voies de signalisation cellulaires (voie non génomique) ou régulant l'expression génique via l'activation de FT.

D'après : Revue Bjornstrom & Sjoberg, 2005, Nilsson *et al.*, 2011a, Murphy, 2011

possèdent moins de 35 % d'homologie avec ER α sur le domaine de liaison au ligand. Ceci expliquerait leur incapacité à fixer l'E2. Ils peuvent toutefois se lier à d'autres composés dotés de propriétés œstrogéniques.

B. Mode d'action et signalisation via les récepteurs des œstrogènes

Les œstrogènes, liposolubles, peuvent entrer librement dans les cellules en traversant la bicouche lipidique. Mais pour exercer leurs effets, génomiques ou non, ils agissent avec divers acteurs cellulaires, comme schématisé sur la figure 26. Une fois dans la cellule, les œstrogènes se fixent sur le domaine E des récepteurs. Le domaine D permet la translocation du complexe dans le noyau, où se forme un dimère grâce au domaine C. Les dimères ainsi formés peuvent être composés de deux récepteurs identiques (homodimère) ou d'un ER α et un ER β (hétérodimère). Ces dimères vont ensuite se fixer, toujours grâce aux domaines C, sur les Estrogen Response Element (ERE), des régions spécifiques de l'ADN situées dans les promoteurs des gènes cibles des œstrogènes, induisant ainsi leur activation (MacGregor & Jordan, 1998). Ceci est la voie d'action dite « classique ». Toutefois, il existe d'autres modes d'action possibles. La seconde voie décrite en figure 26 est indépendante des ERE. Le complexe E2-récepteur n'interagit pas directement avec l'ADN mais se lie à un complexe de facteurs de transcription. La troisième voie d'activation possible est indépendante des œstrogènes, bien qu'utilisant leurs récepteurs alors activés par des facteurs de croissance. Enfin la dernière voie de signalisation passe par Gper. Les œstrogènes s'y fixent et déclenchent une cascade de réactions capables de réguler l'expression génique.

3. LA BIOSYNTHÈSE DES ŒSTROGÈNES

La stéroïdogenèse a lieu à partir du cholestérol, porteur d'un noyau stérane composé de 3 cycles hexagonaux (à 6 carbones) et 1 cycle pentagonal (à 5 carbones). Elle peut se dérouler dans les glandes surrénales (production des corticostéroïdes) et dans les gonades (production des stéroïdes sexuels). Les œstrogènes, hormones féminines primordiales pour la régulation des fonctions sexuelles, appartiennent à la famille des stéroïdes.

Les œstrogènes sont synthétisés à partir de cholestérol dans l'ovaire. Cette biosynthèse ne peut avoir lieu sans les signaux centraux délivrés par la LH et la FSH et requiert deux types cellulaires. Cette théorie de la coopération cellulaire sous contrôle des gonadotropines a été avancée en 1959 par Falck (Falck, 1959) et est présentée sur la figure 27.

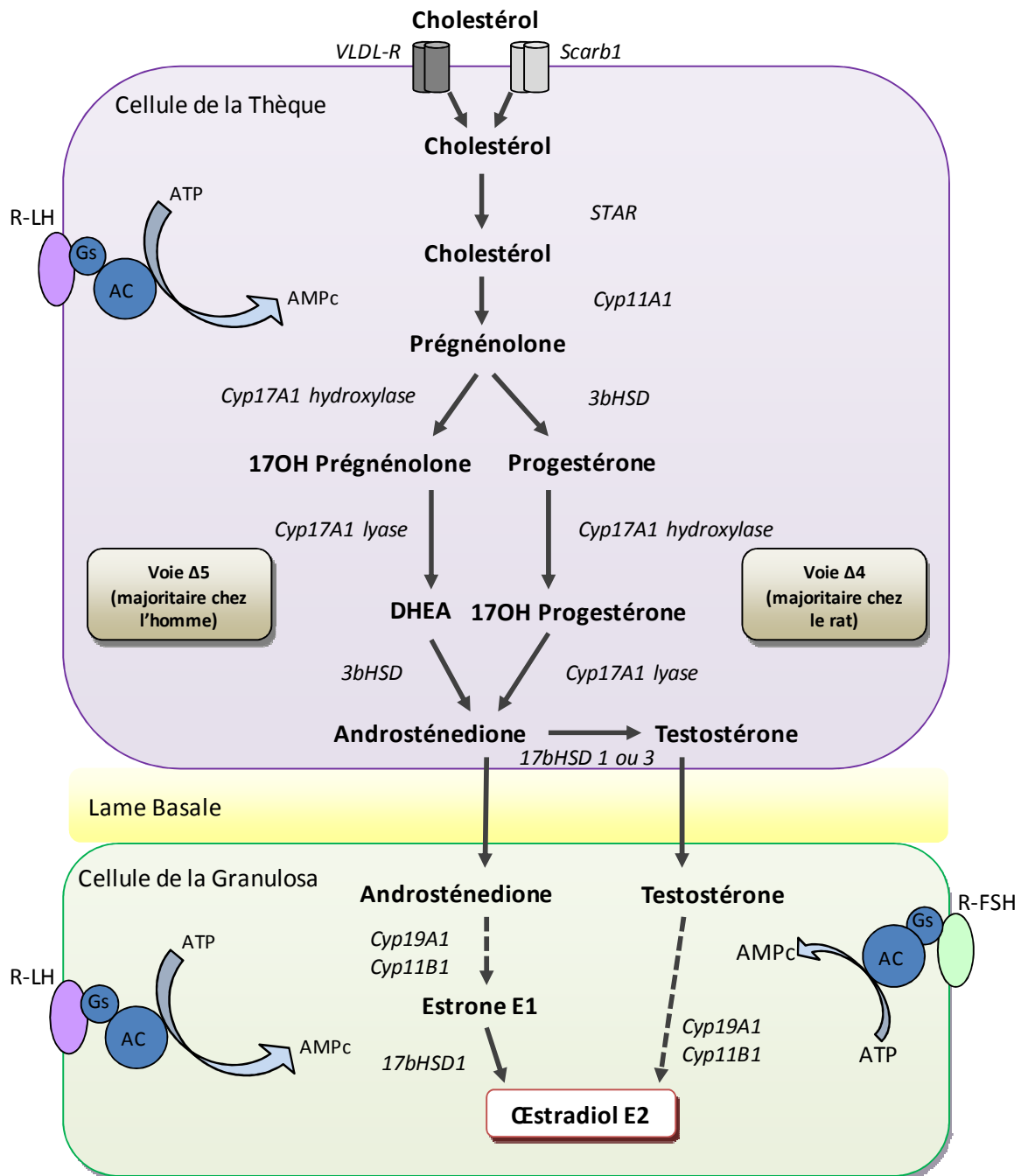


Figure 27 : La synthèse des stéroïdes dans l'ovaire adulte

La stéroïdogénèse ovarienne nécessite la coopération des cellules de la thèque et de la granulosa au sein des follicules. Les cellules de la thèque répondent à la stimulation de la LH via un mécanisme dépendant de l'AMPc en augmentant l'expression des enzymes nécessaires à la conversion du cholestérol en androgènes (androsténedione et testostérone). Les cellules de la granulosa répondent à la stimulation de la FSH en augmentant l'expression des enzymes nécessaires à la conversion des androgènes en œstrogènes (E2 et E1).

3bHSD : 3β hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17bHSD : 17β hydroxystéroïde déshydrogénase ; Ac : adénylate cyclase ; ATP : adénosine triphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; Cyp11A1 : cholesterol side chain cleavage ; Cyp17A1 : lyase ou hydroxylase ; Cyp19A1 : aromatase ; DHEA : dihydroépiandrostérone ; GS : stimulatory G-protein ; R-FSH : récepteur de la FSH ; R-LH : récepteur de la LH ; Scarb1 : scavenger receptor type B1 ; StAr : steroid acute regulatory protein ; VLDL-R : very low density lipoprotein receptor

D'après Magoffin, 2005, Brock & Waterman, 1999, Falck, 1959, Payne & Hales, 2004.

Les cellules de la thèque, présentes sur les follicules en développement à partir du stade secondaire, portent des récepteurs à la LH. Quand celle-ci active ses récepteurs, couplés à des protéines G, le signal médié par l'AMPc induit l'expression des enzymes nécessaires à la conversion du cholestérol en androgènes. Le cholestérol, véhiculé dans la circulation sanguine grâce aux VLDL (very low density lipoprotein), entre dans la cellule grâce au Scarb1 (Scavenger Receptor 1 de la famille B), très exprimé dans les cellules de la granulosa et les corps jaunes ovariens ainsi que dans les glandes surrénales (Landschulz *et al.*, 1996). Le cholestérol pourrait également utiliser les récepteurs des VLDL pour pénétrer dans les cellules (Murata *et al.*, 1998). Il est ensuite pris en charge par le StAR, un transporteur qui l'amène à l'intérieur des mitochondries où il est clivé par le Cyp11A1, aussi appelé p450ssc (Cholesterol Side Chain Cleavage protein), donnant la prégnénolone, qui sort de la mitochondrie. Elle peut suivre 2 voies selon l'espèce considérée : $\Delta 4$ ou $\Delta 5$. Cette différence inter-espèce (voies $\Delta 4$ chez le rat et $\Delta 5$ chez l'homme) est due à la spécificité d'action de la Cyp17A1 lyase. Les propriétés biochimiques de ces deux formes d'enzyme induisent une action préférentielle de la lyase murine sur la 17-hydroxyprogestérone (substrat $\Delta 4$) et une action préférentielle de la lyase humaine sur la 17-hydroxyprégnénolone (substrat $\Delta 5$) (Brock & Waterman, 1999). Donc, selon la voie $\Delta 4$, la prégnénolone est convertie en progestérone par la 3 β HSD puis hydroxylée par la cyp17A1 hydroxylase en 17-hydroxyprogestérone, elle-même convertie en androstènedione par la cyp17A1 lyase. Selon la voie $\Delta 5$, la prégnénolone est d'abord hydroxylée en 17-hydroxyprégnénolone par la Cyp17A1 hydroxylase, puis convertie en dihydroépiandrostérone par la Cyp17A1 lyase. Cette dihydroépiandrostérone est à son tour prise en charge par la 3 β HSD pour donner de l'androstènedione. L'androstènedione est un androgène, tout comme la testostérone qui en dérive après l'action de la 17 β HSD1 (chez le rat) ou 17 β HSD3 (chez l'homme) (pour revue, Payne & Hales, 2004). Ces androgènes peuvent alors rejoindre les cellules de la granulosa. Celles-ci portent des récepteurs de la FSH. Ce sont eux aussi des récepteurs couplés à la protéine G, comme les récepteurs de la LH. Leur signal via l'AMPc augmente la conversion des androgènes en œstrogènes. La testostérone peut être convertie en œstradiol par une aromatisation en plusieurs étapes (figurées en pointillés sur le schéma) faisant intervenir l'aromatase (Cyp19A1) mais aussi le Cyp11B1. Le même mécanisme permet la formation d'œstrone à partir de l'androstènedione. Puis cet œstrone est converti en œstradiol par la 17 β HSD1. Les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire portent également des récepteurs de la LH, renforçant la production d'œstradiol. Les taux circulants d'œstradiol atteignent ainsi un pic juste avant l'ovulation. Avant la puberté, aucun follicule n'échappe à l'atrésie pour atteindre le stade pré-ovulatoire. Donc aucun follicule ne porte de récepteur à la LH sur ses cellules de la granulosa (Guigon *et al.*, 2003a).

4. LE MÉTABOLISME DES ŒSTROGÈNES

In utero, le fœtus est soumis à l'imprégnation hormonale maternelle et notamment aux œstrogènes. Pour se prémunir contre une surexposition à ces hormones, l'animal dispose de protéines capables de se lier aux œstrogènes. Seules les formes libres sont actives biologiquement, les formes liées à l'alpha-fœtoprotéine ou la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) sont inactives (Wu *et al.*, 1976).

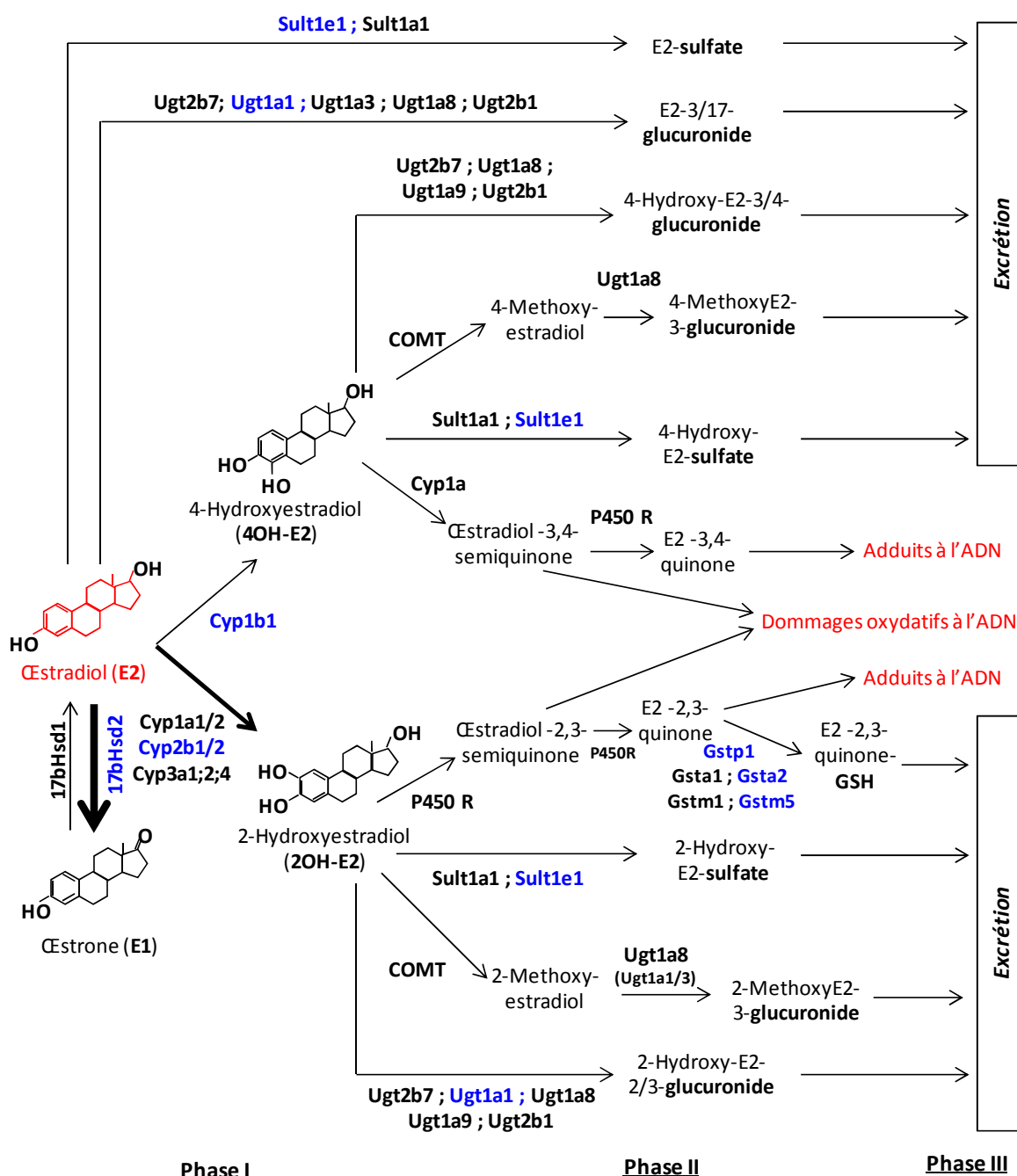


Figure 28 : Le métabolisme des œstrogènes

17βHsd : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase, Cyp : Cytochrome P450, Sult : sulfotransférase, Ugt : UDP-Glucuronosyl-transférase, COMT : Catéchol-O-Méthyltransférase, P450 R : P450 réductase, GSH : glutathion

L'œstradiol peut être pris en charge par différentes enzymes afin de le rendre inactif biologiquement et de faciliter son excrétion. Pour cela, les enzymes de phase 1 procèdent à des réactions d'oxydoréduction permettant aux enzymes de phase 2 de greffer des groupements augmentant l'hydrosolubilité des molécules. Celles-ci sont enfin prises en charge par les transporteurs (phase 3) afin d'être excrétées.

En bleu: les enzymes dont l'expression a fait l'objet d'une étude au cours de cette thèse.

D'après Guillemette *et al.*, 2004, Lakhani *et al.*, 2003, Bianco *et al.*, 2003, Rogan *et al.*, 2003, Abel *et al.*, 2004, Raftogianis *et al.*, 2000, Cavalieri *et al.*, 1997, Shatalova *et al.*, 2005, Yager & Liehr, 1996, Masood *et al.*, 2010, Wilson & Reed, 2001, Parl *et al.*, 2009, Ritter, 2000.

Ces deux molécules ont une très forte affinité pour l'œstradiol. L'alfa-fœtoprotéine lie avec la même affinité l'œstradiol et l'estrone (Versee & Barel, 1978). Ces protéines sont donc impliquées dans la protection du fœtus mais aussi dans la régulation des quantités circulantes d'œstrogènes chez l'animal immature.

Les œstrogènes, ainsi que tous les xénobiotiques pénétrant dans l'organisme, peuvent ensuite être dégradés. Bien que la dégradation des œstrogènes ait également lieu dans l'utérus, le rein, la glande mammaire, le cerveau ou l'hypophyse (pour revue, Zhu & Conney, 1998) l'organe majeur en charge de leur détoxification est le foie. C'est en effet l'un des premiers organes atteints par les molécules absorbées par voie orale via le passage entéro-hépatique et il comporte une large gamme d'enzymes capables de prendre en charge les xénobiotiques pour réduire leur toxicité. Il assure aussi la dégradation de bon nombre de molécules endogènes, participant à leur dynamique de synthèse / dégradation qui régule leur quantité dans l'organisme. Les œstrogènes, stéroïdes liposolubles, sont éliminés par conversion métabolique en formes inactives (ou moins actives) hydrosolubles pour être excrétées via les urines, la bile ou les fèces. Cette conversion métabolique se déroule en 2 phases : la phase I, dite « de fonctionnalisation » NADPH-dépendante et la phase II dite « de conjugaison » présentées sur la figure 28. Chez la femme adulte, le premier passage hépatique à la suite de l'ingestion de 1 mg d'E2 induit une concentration plasmatique d'E1 très supérieure (200 pg/ml) à celle d'E2 (40-50 pg/ml) quatre heures après la prise, suggérant l'importance métabolique de la conversion E2→E1 (Lobo & Cassidenti, 1992). Cette conversion a pour but de former un métabolite biologiquement moins actif que E2 afin de se prémunir contre une surdose d'E2. En effet, l'activité biologique d'un œstrogène est liée à sa capacité à se fixer sur ses récepteurs et à y rester ancré, activant ainsi la cascade de réactions (pour rappel, figure 26, page 82) à l'origine de l'intensité de la réponse au stimulus. Si E1 et E2 ont tous deux la même affinité pour les récepteurs des œstrogènes, E1 s'en dissocie bien plus rapidement, diminuant ainsi la durée de son action biologique (Weichman & Notides, 1980).

A. Phase 1 : Fonctionnalisation

La phase I de fonctionnalisation a pour but de créer un métabolite intermédiaire électrophile sur lequel pourra s'exercer la phase II. Elle est assurée par des enzymes appartenant à trois catégories : les oxydases, les réductases et les hydrolases. En 1964, Omura et Sato démontrent que dans les microsomes de foie de lapin, des protéines pigmentaires nommées « cytochromes » ont une longueur d'onde d'absorption -450 nm- caractéristique des protéines hémiques à l'état réduit (Omura & Sato, 1964). Ces Cytochromes P 450 (P signifiant « pigment ») sont les principales enzymes (en nombre et en activité) intervenant au cours de la phase I. La nomenclature de ces enzymes respecte le schéma suivant : la racine « Cyp » suivie d'un numéro identifiant chaque famille (regroupant des formes avec au moins 40% d'homologie), une lettre désignant la sous-famille (formes avec plus de 55 % d'homologie) et un numéro d'isoforme.

		Homme	Rat	Souris
Cyp1	A	1a1	1a1	1a1
		1a2	1a2	1a2
	B	1b1	1b1	1b2
Cyp2	A		2a1	
			2a2	
			2a3	
				2a4
				2a5
		2a6		
		2a7		
				2a12
		2a13		
				2a22
	B		2b1	
			2b2	
			2b3	
		2b6		
		2b7		
				2b9
				2b10
Cyp2	C		2c6	
			2c7	
		2c8		
		2c9		
			2c11	
			2c12	
			2c13	
		2c18		
		2c19		
			2c22	
			2c23	
				2c29
				2c37
				2c38
				2c39
				2c40
				2c44
				2c50
				2c54
				2c55

		Homme	Rat	Souris
Cyp2	D		2d1	
			2d2	
			2d3	
			2d4	
			2d5	
		2d6		
		2d7		
		2d8		
				2d9
				2d10
				2d11
				2d12
				2d13
			2d18	
				2d22
				2d26
				2d34
				2d40
	E	2e1	2e1	2e1
Cyp3	A		3a1	
			3a2	
		3a4		
		3a5		
		3a7		
			3a9	
				3a11
				3a13
				3a16
			3a18	
				3a25
				3a41
		3a43		
				3a44
			3a62	

Tableau 3 : Principales familles de Cytochromes P450 chez l'homme, le rat et la souris. Les formes en rouge sont impliquées dans le métabolisme des œstrogènes. D'après Martignoni *et al.*, 2006, Masood *et al.*, 2010, Yager & Liehr, 1996, Wilson & Reed, 2001.

Chez l'homme, plus de 50 isoformes ont été dénombrées. Dans le tableau 3 sont présentées plus particulièrement les familles 1, 2 et 3, comprenant respectivement 2, 5 et 1 sous-familles (pour revue, Martignoni *et al.*, 2006).

Les isoformes présentées peuvent être partagées par plusieurs espèces (par exemple Cyp1) ou spécifiques. Il est également à noter que si la spécificité de substrat d'une famille enzymatique peut être conservée d'une espèce à l'autre, ça n'est pas toujours le cas. Par exemple la famille 3A chez le rat n'est pas inductible par la rifampicine, un inducteur classique des Cyp3a chez l'homme et certains substrats des Cyp3a humains ne sont pas pris en charge par les Cyp3a murins (Martignoni *et al.*, 2006). C'est pourquoi dans le cadre de notre étude sur le métabolisme des œstrogènes, nous avons ciblé uniquement des isoformes connues pour agir sur les œstrogènes chez le rat.

D'après Wilson & Reed, l'œstradiol (E2) est majoritairement oxydé en C17 (figure 29) par la 17 β -Hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 2 pour former l'estrone E1, qui peut être à nouveau converti en œstradiol par la 17 β -Hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 1 (Wilson & Reed, 2001). L'E2 peut également être oxydé sur d'autres carbones : en C2 ou C4, conduisant à la formation des catécholestrogènes 2-hydroxyestradiol (2OH-E2) et 4-hydroxyestradiol (4OH-E2) ou en C16 (Masood *et al.*, 2010).

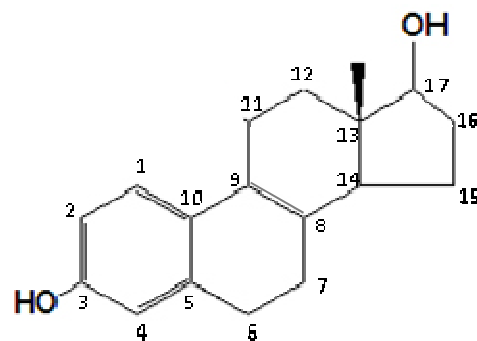


Figure 29 : Numérotation des carbones sur la molécule d'œstradiol (E2)

La voie des quinones semble jouer un rôle bioactivateur : les métabolites formés (œstradiol-2,3-quinone, œstradiol-3,4-quinone) ou les réactions d'oxydo-réduction mises en place pour leur formation sont plus nocifs que la molécule mère. Les œstrogènes ont donc la capacité d'induire des dommages à l'ADN, soit en formant des adduits, soit par génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

		Homme	Rat	Souris
Ugt1	A	1	1	1
		(2)	2	2
		3	3	(3)
		4	(4)	(4)
		5	5	5
		6	6	6
		7	7	(7)
		8	8	8
		9	(9)	
		10	10	10
		(11)		(11)
		(12)		
		(13)		
Ugt2	A	1	1	1
		2	2	2
		3	3	3
	B		1	1
			2	
			3	
		4		
				5
			6	
		7		
			8	
		10		
		11		
			12	
		15		
		17		
		(24)		
		(25)		
		(26)		
		(27)		
		28		
		(29)		
			34	34
				35
				36
				37
				38
Ugt3	A			1
		2		2
Ugt8	A	1	1	1

← Tableau 4 : Les différentes familles d'UGT chez l'homme, le rat et la souris. Les enzymes apparaissant en rouge sont connues pour être impliquées dans le métabolisme des œstrogènes. Quatre familles (1, 2, 3 et 8) sont connues. Les familles Ugt1A et 2B comprennent beaucoup de membres non fonctionnels, des pseudogènes, indiqués entre parenthèses.

D'après Shiratani *et al.*, 2008, Mackenzie *et al.*, 2005, Itaaho *et al.*, 2008

		Homme	Rat	Souris
Sult1	A	1	1	1
		2		
		3		
	B	1	1	1
			1	1
	C	2	2	2
			3	
		4		
	D		1	1
	E	1	1	1
Sult2	A	1	1	1
			2	2
			3	
			4	
	B	1		1
Sult3		non rapportée		1
Sult4	A	1	1	1
Sult5		non rapportée		1
Sult6	B	1		

↑ Tableau 5 : Classification des sulfotransférases chez l'homme, le rat et la souris.

Les SULT impliquées dans le métabolisme des œstrogènes sont indiquées en rouge. Toutes les espèces ne disposent pas du même équipement enzymatique. La plus spécifique des œstrogènes est la Sult 1E1, le « E » signifiant « estrogen ».

D'après Blanchard *et al.*, 2004

B. Phase 2 : Conjugaison

La phase de conjugaison fait intervenir différentes familles d'enzymes et nécessite des donneurs de groupements réactifs permettant l'inactivation et facilitant l'excrétion de nombreuses molécules endogènes et xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité. Ainsi les hydroxyestrogènes formés en phase 1 peuvent être pris en charge soit par la famille des UDG-glucuronosyl-transférases (UGT), soit par des sulfotransférases (SULT), soit par des glutathion-S-transférases (GST), soit par des catéchol-O-méthyle-transférases (COMT).

Les Uridine 5'-DiPhospho-GlucuronosylTransférases (UDP-GT ou UGT)

Les UGT (tableau 4) transfèrent un groupement polaire acide glucuronique (fourni par un donneur ubiquitaire appelé UDP-GA (uridine diphosphate glucuronic acid), pour revue, Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006)) sur la molécule à détoxiquer, augmentant ainsi son hydrosolubilité. La voie des dérivés glucuronides est la voie métabolique principale pour les œstrogènes (Lepine *et al.*, 2004). Ceux-ci sont pris en charge par les Ugt1a1, 1a3, 1a9 et 2b1 et 2b7, greffant des groupements en C2, C3 ou C4 (voir références accompagnant la figure).

L'isoforme Ugt2b7 humaine, (figurant sur la figure 28) est très active sur les œstrogènes mais n'existe pas chez le rat. Les UGT de la famille 2B sont les plus actives sur l'E2 et les hydroxymétabolites. En revanche la famille 1A est plus active sur les méthoxymétabolites (Guillemette *et al.*, 2004).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'expression de Ugt1a1. L'activité de glucuronoconjugaison de l'œstradiol, assurée notamment par cette enzyme, est plus importante dans l'intestin que dans le foie chez l'homme (Fisher *et al.*, 2000) mais il semble que ça soit l'inverse chez le rat mâle comme femelle (Shiratani *et al.*, 2008). Chez le rat adulte, cette enzyme est constitutivement mais faiblement exprimée dans le foie et plus fortement exprimée dans la gonade mâle et femelle ou encore le rein. Après un traitement au TCDD (tétrachlorodibenzodioxine, molécule possédant des propriétés œstrogéniques Ndebele *et al.*, 2010) l'expression augmente fortement dans le foie et de façon beaucoup plus modérée dans les gonades (Munzel *et al.*, 1994). L'activité de la famille UGT a été rapportée dans l'ovaire à 26 jpn mais pas chez des animaux plus jeunes et les membres actifs de cette famille n'ont pas été identifiés dans cette étude (Becedas & Bengtson Ahlberg, 1995).

Les Sulfotransférases (Sult)

Les sulfotransférases (tableau 5) transfèrent un groupement sulfate d'un donneur ubiquitaire, la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) vers l'accepteur, toujours dans le but d'augmenter son hydrosolubilité (Negishi *et al.*, 2001).

Il existe une forme de sulfotransférase spécifique des œstrogènes, la Sult1e1. Toutefois, l'importance de cette enzyme dans le processus de détoxification des œstrogènes est débattue. En effet, il existe de fortes disparités selon le sexe démontrées chez le rat (Hirao *et al.*, 2011) ainsi que chez la souris (Luu-The *et al.*, 2005). Cette prédominance chez le mâle viserait à le protéger des effets des œstrogènes

Solubles

GST	A	Homme	Rat	Souris
		1	1	1
		2	2	2
		3	3	3
		4	4	4
		5	5	5
	M	1	1	1
		2	2	2
		3	3	3
		4	4	4
		5	5	5
			6	6
				7
	P	1	1	1
				2
	T	1	1	1
		2	2	2
				3
	O	1	1	1
		2	2	2
	Z	1	1	1
	PGD2/Gst S	1	1	1

Microsomaux

MGST	Homme	Rat	Souris
	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3
PGES			
FLAP			
LTC4 synthase			

Mitochondriales

	Homme	Rat	Souris
GSTK	1	1	1

Tableau 6 : Les différentes familles de GST chez l'homme, le rat et la souris.

Les GST impliquées dans la détoxification des œstrogènes sont indiquées en rouges. La GST S (Sigma) est aussi appelée glutathione-dépendant prostaglandin D2 synthase.

D'après Mannervik *et al.*, 2005, Bresell *et al.*, 2005 ; Morel & Aninat, 2011 ; Mukherjee *et al.*, 1999, Raza, 2011

en les inactivant. Dans cette dernière étude, la Sult1e1 n'a pas -ou très peu- été détectée chez la femelle. Cependant des souris Knock-Out pour le gène de la Sult1e1 ne sont pas capables de réguler leurs taux circulants d'œstradiol et sont donc constamment en surexposition, empêchant l'ovulation et réduisant la fertilité (Gershon *et al.*, 2007) ce qui tendrait à prouver que cette enzyme est essentielle à la dynamique de synthèse / dégradation des œstrogènes. Par ailleurs, l'induction de l'expression de cette enzyme par la Biochanine A (isoflavone à activité œstrogénique) a été rapportée dans le foie de rat mâle adulte, mais pas chez la femelle (Chen *et al.*, 2010), confirmant ainsi les disparités d'équipement enzymatique liées au sexe. La Sult1a1 est moins spécifique mais prend aussi en charge des stéroïdes avec une affinité moindre par rapport à celle de Sult1e1 (Blanchard *et al.*, 2004) et son expression est augmentée par la Biochanine A, tant chez le mâle que chez la femelle dans l'étude de Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2010). Là encore, l'activité de la famille SULT a été rapportée dans l'ovaire à 26 jpn mais pas chez des animaux plus jeunes et les membres actifs de cette famille n'ont pas été identifiés avec précision dans cette étude (Becedas & Bengtson Ahlberg, 1995).

Les Glutathion-S-Transferases (GST)

Les GST (tableau 6) catalysent l'ajout d'une molécule de glutathion (GSH) sur la molécule à détoxifier en présence de NADPH. Le glutathion libre est présent et fonctionnel dans le foie de rat dès la naissance mais augmente progressivement pour atteindre un niveau stable à 14 jpn (Gonzalez *et al.*, 1995; Novak *et al.*, 2012). Ces variations sont dues à l'augmentation des enzymes synthétisant le GSH à partir de la naissance parallèlement à la diminution progressive au cours de la première semaine de vie du taux de GGT, les enzymes responsables de la dégradation du GSH (Tateishi *et al.*, 1980). Les premières GST identifiées furent les GST solubles (ou cytosoliques) dont il existe six classes portant le nom d'une lettre grecque. Ainsi la famille Alpha apparaîtra dans la nomenclature avec la lettre « A » (plus facile à utiliser que la lettre grecque d'origine), la famille Mu portera la lettre M, etc... Il existe aussi des GST microsomales (ou Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism, MAPEG) et des GST mitochondriales (ou Kappa). Ces GSTK n'existent que sous une seule forme chez l'homme et le rongeur mais sous deux formes chez d'autres organismes (*Caenorhabditis Elegans*, par exemple) (Petit *et al.*, 2009). Les GSTM1 et 2 sont capables de prendre en charge les œstrogènes et leur présence a été rapportée dans le testicule et même dans les cellules germinales de rat mâle, puisque ces enzymes sont également impliquées dans la spermatogenèse (Mukherjee *et al.*, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 2005). Chez la femelle, la présence de plusieurs GST a été rapportée, dans le foie mais aussi dans l'ovaire. L'expression en ARNm, en protéine ou l'activité des GST peut être modifiée dans ces deux organes par des xénobiotiques (tableau 7, page suivante). Le VCD, vinylcyclohexene diepoxycide, est connu pour ses propriétés ovotoxiques (Flaws *et al.*, 1994). Toutefois il ne semble pas avoir de pouvoir œstrogénique contrairement à l'EB ou la génistéine (GEN). Les trois xénobiotiques modifient l'expression des Gst. À ma connaissance, il n'y a pas d'étude sur l'influence des composés œstrogéniques sur l'expression des Gst dans les gonades.

		GST	Rat	Souris	Macaque	Traitement	Variation	Variation Activité	Référence
Ovaire	Néonatal	M	X			VCD	= (ARNm) ↗ (prot)		Bhattacharya et al., 2013
		P		X		VCD	↗ (ARNm) ↗ (prot)		Keating et al., 2008
		M		X		VCD	↗ (ARNm) = (prot)		

Foie	♀ adulte	M5			X	EB	↗ (ARNm)		Ise et al., 2012
	♂ adulte	P1	X			GEN	↘ (ARNm)	stable	Wiegand et al., 2009
		A2	X			GEN	↗ (ARNm)		
		M2	X			GEN	↘ (ARNm)		
		P1	X			E2	↗ (ARNm)		Coecke et al., 2000

Tableau 7 : Modification des niveaux d'expression de différentes Gst dans l'ovaire et le foie dans trois espèces sous l'influence de trois xénobiotiques.

Les variations d'ARNm ne reflètent pas nécessairement les variations protéiques ni même l'activité enzymatique. Prot : protéine.

Les Catechol-O-MethylTransferases (COMT)

Les COMT ont pour fonction d'inactiver les hydroxy-métabolites des œstrogènes en leur transférant un groupement méthyle provenant d'une S-adénosylméthionine (Tong & D'Iorio, 1977). Cette famille d'enzymes, contrairement à celles décrites précédemment, ne contient que deux isoformes dérivant d'un gène unique sous la dépendance de deux promoteurs différents. L'un induit la production d'une COMT sous forme soluble, le second produit une COMT membranaire (Tenhunen & Ullmanen, 1993). Chez la ratte adulte, un traitement à l'E2 ne modifie ni l'expression protéique, ni l'activité des COMT, que ce soit sous leur forme membranaire ou soluble. En revanche, chez le mâle, E2 modifie l'expression protéique ainsi que l'activité de façon très hétérogène selon le tissu considéré, par exemple le taux de protéine diminue dans le rein mais augmente fortement dans la prostate (Schendzielorz *et al.*, 2011).

Les régulations des différentes enzymes du métabolisme peuvent avoir lieu à plusieurs niveaux: régulation transcriptionnelle (variation du nombre de transcrits ARN de l'enzyme considérée), variation de la quantité de protéines, variation de l'activité enzymatique (non nécessairement liée à la quantité de transcrits présents) ou encore la déplétion en co-facteurs (privation de groupements sulfate ou glucuronides, épuisement du glutathion libre).

Les nombreuses réactions de dégradation des œstrogènes présentées ici entrent en fait dans un processus dynamique d'équilibre entre la synthèse des œstrogènes et leur dégradation afin de réguler constamment leurs taux circulants. Il existe donc des enzymes capables de produire les réactions chimiques inverses et de reformer de l'œstradiol biologiquement actif. Ceci est très important dans le cas des métabolites sulfatés, considérés comme des formes de stockage temporaire pour assurer une régulation fine des concentrations d'E2 (Lievertz, 1987; Guengerich, 1990). Les sulfatases ont donc pour fonction de cliver le groupement sulfate conjugué à la molécule d'E2 afin de le rendre actif.

C. Phase 3 : Transport, excrétion

Les dérivés sulfates, glucuronides ou conjugués au glutathion sont généralement trop hydrophiles pour diffuser de façon passive à travers les membranes. Ils sont donc pris en charge par des protéines de phase III : des transporteurs ayant pour fonction leur excrétion de la cellule à destination de la bile ou de la circulation sanguine puis des urines.

De façon générale, les transporteurs sont divisés en 2 superfamilles : les *solute carrier* (SLC) et les *ATP-Binding Cassette Transporters* (ABC). Ces superfamilles sont elles-mêmes divisées en sous-familles (pour revue, Klaassen & Aleksunes, 2010) dont voici les principales :

SLC

Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)
Organic Anion Transporter (OAT)
Organic Cationic Transporter (OCT)
Organic Cation/Carnitine Transporter (OCTN)

ABC

Multidrug Resistance Protein (MDR)
Multidrug Resistance Associated Protein (MRP)
Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)
Bile Salt Export Pump (BSEP)

Oatp1a	1	Mrp	1
	4		2
Oatp1b	1		3
	2		4
	3	P-gp	
Oatp2b	1	Oat	3
Bcrp			4

Tableau 8 : Les transporteurs capables de prendre en charge les œstrogènes.

La P-gp = phospho-glycoprotéine est codée par le gène MDR-1.

D'après : Klaassen & Aleksunes, 2010; Sun *et al.*, 2006 ;Miyagawa *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2010, Gong *et al.*, 2011, Gosland *et al.*, 1993, Sivils *et al.*, 2010

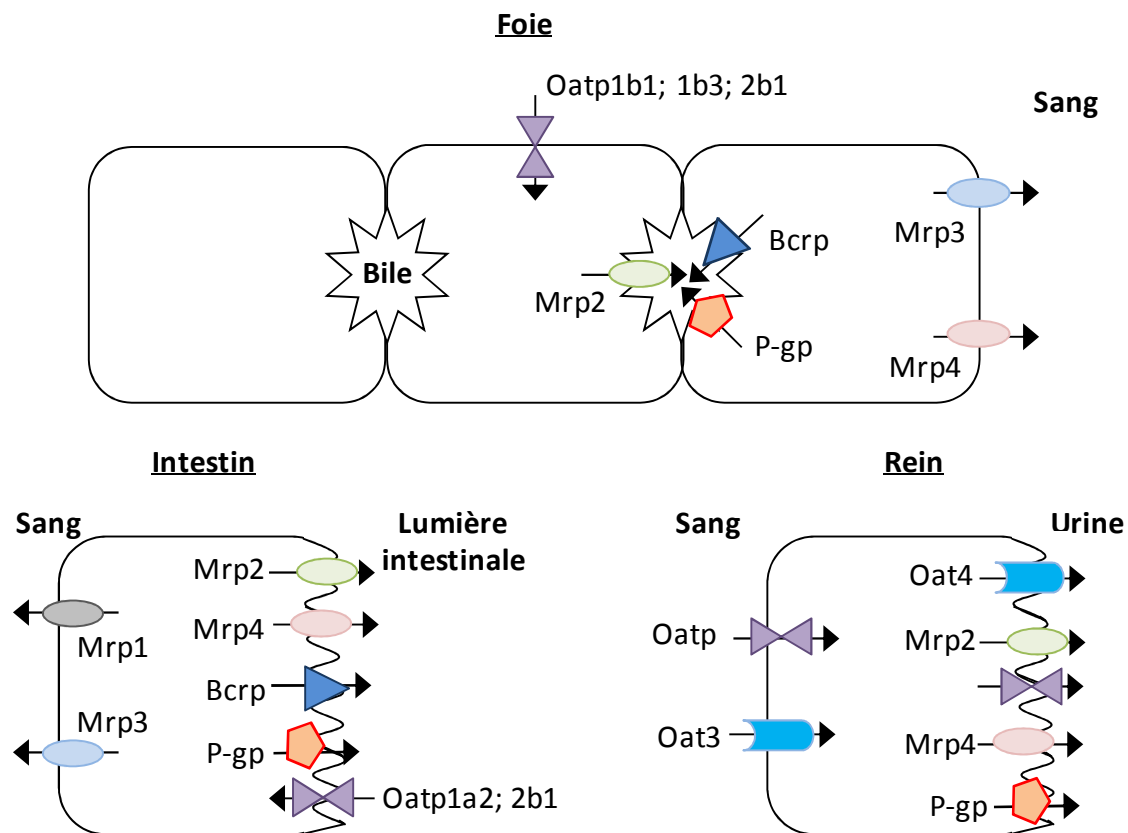


Figure 30 : Les transporteurs des métabolites des œstrogènes dans les hépatocytes (en haut), les entérocytes (en bas à gauche) et le tubule rénal proximal (en bas à droite).

Chacun des types cellulaires possède des transporteurs orientés (ne fonctionnant que dans un sens) capables de laisser entrer ou sortir les œstrogènes ou leurs métabolites.

D'après : Sun *et al.*, 2006, Launay-Vacher *et al.*, 2006, Matheny *et al.*, 2001, Tamai, 2012, Giacomini *et al.*, 2010, Kanai *et al.*, 1996, Giacomini & Huang, 2013; Yoshida *et al.*, 2013.

Ces sous-familles contiennent elles-mêmes une grande diversité de membres et parmi eux, certains ont une forte affinité pour les œstrogènes ou leurs dérivés, ils sont présentés dans le tableau 8. Ces divers transporteurs sont exprimés dans les organes en charge de l'épuration de l'organisme : le foie (via l'élimination biliaire), l'intestin (via l'élimination fécale) et le rein (via l'élimination urinaire) et présentés en figure 30.

Les transporteurs sont essentiels à la régulation des quantités circulantes d'œstrogènes. Ainsi les souris dont les gènes codant pour Oatp1a1 et 1a4 ont été invalidés voient leurs capacités d'influx d'E2 diminuées (Gong *et al.*, 2011). Les souris mâles dont le gène codant pour Mrp1 est inactif ont des difficultés pour réguler leurs taux de stéroïdes circulants (Sivils *et al.*, 2010).

L'élimination fécale des œstrogènes est mineure et ceci s'explique probablement par l'équipement des entérocytes en transporteurs, autorisant la sortie des dérivés œstrogéniques à la membrane apicale mais peu leur entrée à la membrane basale. L'entrée des œstrogènes dans les cellules intestinales est également autorisée à la membrane apicale, expliquant que l'absorption orale d'œstrogènes permette de délivrer dans l'organisme des doses « efficaces » (contraceptifs oraux (Hanker, 1990), mais aussi contamination par des xéno-œstrogènes alimentaires tels que le BPA (Inoue *et al.*, 2003), la génistéine (Sfakianos *et al.*, 1997)...). Dans les hépatocytes en revanche, les dérivés œstrogéniques peuvent pénétrer dans les cellules à la membrane baso-latérale via la famille des transporteurs Oatp et être excrétés dans les canaux biliaires par Mrp2, Bcrp ou encore la P-gp. Mais ils peuvent aussi être excrétés vers la circulation sanguine via Mrp3 et 4. Le sang est ensuite filtré dans les reins, et notamment au niveau du tubule rénal proximal. Celui-ci dispose également d'un équipement en transporteurs permettant l'entrée des dérivés œstrogéniques à la membrane baso-latérale et leur sortie à la membrane apicale vers la lumière du tubule et donc vers les urines. L'élimination des œstrogènes est donc intégrée dans une dynamique d'entrée / sortie impliquant plusieurs acteurs.

Les disparités d'équipement enzymatique peuvent dépendre de l'espèce, du sexe et de l'organe considéré. En effet, chez le rat, l'expression rénale des Oatp est largement supérieure chez le mâle mais elle est équivalente dans le foie chez les deux sexes (Lu *et al.*, 1996; Gotoh *et al.*, 2002). Alors que chez la souris, Oatp1a1 est prédominant dans le foie mâle, Oatp1a4 l'est dans le foie femelle. Dans le rein, Oatp1a1 et 3a1 sont tous deux prédominants chez la femelle (Cheng *et al.*, 2006).

Les transporteurs peuvent être régulés par les hormones sexuelles. Par exemple, la testostérone augmente l'expression rénale et hépatique de certains Oatp, chez le mâle comme la femelle, chez la souris (Cheng *et al.*, 2006). Mais d'autres membres de la même famille de transporteurs sont inhibés par la testostérone (Cheng *et al.*, 2006). Par ailleurs, la régulation par les hormones ou xéno-hormones est également dépendante de l'organe considéré : si chez le rat la testostérone augmente l'expression rénale des Oatp, elle n'a pas d'influence sur leur expression hépatique (Lu *et al.*, 1996).

Les effets des œstrogènes sur l'expression des transporteurs sont également controversés : sans influence sur les Oatp testés dans le rein chez la souris (Cheng *et al.*, 2006). Ils semblent diminuer leur expression dans le rein de rat (Lu *et al.*, 1996). Alors qu'en 1997 Trauner *et al.* ne relataient aucune influence d'un traitement à l'éthinylestradiol sur l'expression hépatique de P-gp et Mrp2 (Trauner *et al.*, 1997), Ruiz *et al.* décrivent en 2006 une diminution de Mrp2 par cette molécule chez le rat mâle (Ruiz *et al.*, 2006). Cette modification de l'expression de Mrp2 est par ailleurs à mettre en parallèle avec l'expression d'un autre transporteur dans le même modèle. En effet l'EE administré à des rats mâles adultes réduit l'expression de Mrp2 à la membrane apicale et augmente l'expression de Mrp3 à la membrane basolatérale des hépatocytes. L'excrétion biliaire est donc réduite mais l'augmentation de Mrp3 permet de prévenir l'accumulation de EE dans les cellules en augmentant son excrétion dans la circulation sanguine (Ruiz *et al.*, 2006).

L'excrétion des métabolites est donc le résultat d'une coopération inter-organes ainsi que d'une dynamique de synthèse / dégradation et efflux / influx. Si l'un des organes impliqués dans ces mécanismes est pathologique, défectueux ou altéré par un toxique, l'équilibre du système s'en trouve modifié. Par exemple chez des rats porteurs d'une défaillance rénale chronique, l'expression de Mrp2, Mrp3 et P-gp est diminuée dans le foie, sans toutefois avoir d'influence sur Oatp2 et 3. (Naud *et al.*, 2007). Et des rats mâles développant une tumeur métastatique induite par injection de cellules dérivées de carcinome de colon ont une expression hépatique de Oatp1a1 et 1b2 diminuée (Sun *et al.*, 2006).

Le métabolisme présenté dans ce chapitre est valable pour E2 et ses dérivés toutefois les études impliquant une imprégnation œstrogénique excessive utilisent souvent des esters d'œstradiol tels que Estradiol Benzoate (EB), Estradiol Valerate (EV) et Estradiol Cypionate (EC), qui ont une demi-vie dans l'organisme plus longue. En effet, une étude réalisée chez l'homme (Oriowo *et al.*, 1980) a démontré qu'après une injection de 5 mg de chacun de ces trois esters, les pics de concentration plasmatiques d'E2 et E1 étaient différés : deux jours après exposition pour EB et EV, quatre pour EC. Ces concentrations élevées persistaient quatre jours pour EB, sept pour EV et onze pour EC. Ces données suggèrent que la métabolisation de EB est plus rapide que celle de EV mais aussi que EC est l'ester le plus long à métaboliser.

L'E2 et les composés œstrogéniques peuvent modifier leur propre métabolisme mais de façon très hétérogène, dépendamment du sexe, de l'organe considéré mais aussi de l'âge puisque les capacités métaboliques d'un individu varient énormément au cours de la vie.

D. La maturation du système

L'équipement métabolique n'est pas figé au cours de la vie et pleinement fonctionnel dès la naissance. Chez l'homme, les enfants ont notamment des capacités de glucuronoconjugaison très limitées. Les variations de pharmacocinétique expliquent les différences de sensibilité à divers traitements et nécessitent de proposer une médication spécifique pour les très jeunes patients. (Pineiro-Carrero & Pineiro, 2004).

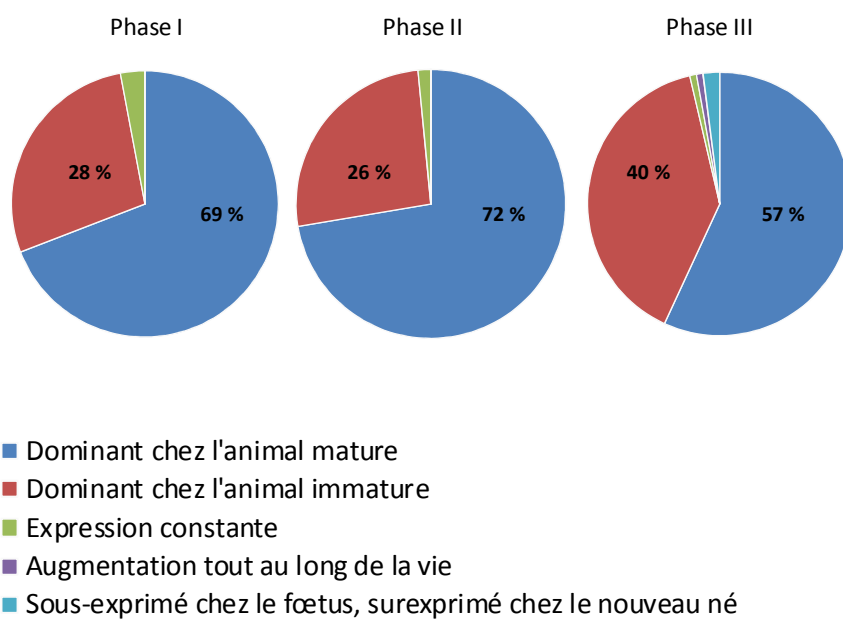


Figure 31 : Diagramme de répartition du nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de métabolisation selon leur profil d'expression et l'âge de l'animal.

D'après les données brutes de Lee *et al*, obtenues par microarrays sur du foie de souris

Chez le rat, le système de métabolisation acquiert progressivement sa maturité. Par exemple, Fischer & Weissinger ont établi que la demi-vie du DES était presque 10 fois plus longue chez le nouveau-né que chez l'individu âgé de 25 jours parce que le nouveau-né présente une faible capacité de conjugaison et d'excrétion biliaire du DES (Fischer & Weissinger, 1972). Selon le même raisonnement, Taylor *et al.* testent l'influence de la voie d'exposition sur la toxicité du BPA chez l'animal néonatal et démontrent que contrairement à l'adulte, les effets sont les mêmes dans le cas d'une exposition sous-cutanée ou orale (Taylor *et al.*, 2008). Ceci serait dû à la perte d'impact du premier passage hépatique lors de l'exposition orale chez le nouveau-né. Le système de détoxification, immature, ne permet pas d'éliminer partiellement la molécule active avant son passage systémique et son acheminement vers ses organes-cibles.

En 2011, Corton et son équipe travaillent sur la maturation et l'évolution au cours de la vie du système de détoxification de la souris (Lee *et al.*, 2011). À partir de leurs données brutes générées par analyse de morceaux de foie par microarray, j'ai observé la répartition de gènes codant pour des Cyp450, des enzymes de phase II et des protéines de phase III et isolé 5 grands profils d'expression de gènes :

1. Gènes dont l'expression est réduite chez l'animal fœtal et/ou néonatal (immature) par rapport à l'animal adulte (6 mois). Ces gènes sont donc préférentiellement exprimés par l'animal mature.
2. Gènes dont l'expression est augmentée chez l'animal fœtal et/ou néonatal par rapport à l'adulte. Ces gènes sont donc préférentiellement exprimés par l'animal immature.
3. Gènes dont l'expression semble constante tout au long de la vie.
4. Gènes dont l'expression augmente tout au long de la vie.
5. Gènes dont l'expression est diminuée chez l'animal fœtal mais augmentée chez le néonatal, puis atteint un taux basal un peu plus faible pour le reste de la vie.

La répartition de ces profils selon la nature des protéines codées par ces gènes (phases I, II ou III) est présentée sur la figure 31.

La plus grande partie des gènes considérés (entre 55 et 72 % selon la phase) a une expression préférentielle chez l'animal adulte. Toutefois, l'animal immature a des outils spécifiques de métabolisation. En effet entre 25 et 40 % des gènes considérés ont une expression préférentielle chez l'animal fœtal et/ou néonatal. Par ailleurs, dans chaque catégorie de gènes étudiés, le vieillissement de l'animal induit lui aussi des modifications d'expression. Dans la plupart des cas, l'expression est réduite, mais elle peut aussi être augmentée. Ainsi parmi les Cyp, 26.5% des gènes étudiés voient leur expression modifiée à l'âge de 24 mois. Parmi les gènes codant pour des enzymes de phase II, 23.1% ont une expression modifiée chez l'animal âgé. Les gènes codant pour des protéines de phase III sont 10.9% et la proportion d'augmentation de l'expression est presque aussi importante que la proportion de diminution. Dans cette catégorie, il semble que les gènes dont l'expression était augmentée chez l'animal fœtal et néonatal soient en partie réactivés à 24 mois alors que les gènes fortement exprimés uniquement chez le néonatal sont plutôt réduits.

Phase I	Période			Références
	Espèce	Fœtale	Néonatale	
Cyp1a1	rat	-	↘	Lui <i>et al.</i> , 2010
Cyp1a1	rat	↗	↗	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Cyp1a1/2*	rat	↘↘	↘↘	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Cyp1a2	souris	↘↘	↘↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Cyp1a2	rat	↘↘	↘↘	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Cyp1a2	humain	absente	↘↘	Shimada <i>et al.</i> , 1996
Cyp1b1	souris	↘↘	↘↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Cyp2b1	rat	-	↗	Asaoka <i>et al.</i> , 2010
Cyp2b2	rat	-	↗	Asaoka <i>et al.</i> , 2010
Cyp2b1/2*	rat	↘↘	↘↘	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Phase II	Période			Références
	Espèce	Fœtale	Néonatale	
Comt	rat	-	↘	Tellgren <i>et al.</i> , 2003
Comt	souris	↘↘	↘↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Gsta3	souris	↘	↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Gstm1 & 2	souris	↘	↘	Lee <i>et al.</i> , 2011 ; Cui <i>et al.</i> , 2010
Gstm	humain	↘	↗	McCarver & Hines, 2002
Sult1a1	souris	=	↗	Lee <i>et al.</i> , 2011
Sult1a1	humain	↘	↘	McCarver & Hines, 2002
Sult1a3	humain	↗	↗	McCarver & Hines, 2002
Ugt1a1	humain	absente	=	McCarver & Hines, 2002
Ugt1a3	humain	↘	↘	McCarver & Hines, 2002
Ugt2b1	rat & souris	↘↘	↘↘	Matsumoto <i>et al.</i> , 2002
Ugt2b7	humain	↘↘	↘	Strassburg <i>et al.</i> , 2002
Phase III	Période			Références
	Espèce	Fœtale	Néonatale	
Bcrp	rat	↗	↗	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Bcrp	souris	=	↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Mrp1	rat & souris	↗	↗	de Zwart <i>et al.</i> , 2008, Lee <i>et al.</i> , 2011
Mrp2	rat & souris	↘↘ surtout chez femelle		de Zwart <i>et al.</i> , 2008., Lee <i>et al.</i> , 2011
Mrp3	rat	↗	↗	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Mrp3	souris	↘	↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Mrp4	souris	↗	=	Lee <i>et al.</i> , 2011
Oat3	rat	↗	↗	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Oatp1a1	souris	↘↘	↘↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
Oatp1a4	rat	↘	↘	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
Oatp1a4	souris	↘	=	Lee <i>et al.</i> , 2011
Oatp1b2	souris	↘	↗	Lee <i>et al.</i> , 2011
Oatp2b1	souris	↘↘	↘↘	Lee <i>et al.</i> , 2011
P-gp	rat	↘	↘	de Zwart <i>et al.</i> , 2008
P-gp	souris	=	↗	Lee <i>et al.</i> , 2011
Autres	Période			Références
	Espèce	Fœtale	Néonatale	
Sulfatase	souris	↗	↗	Lee <i>et al.</i> , 2011
17bHSD2	rat	↗	↗	Akinola <i>et al.</i> , 1997

Tableau 9 : Expression de diverses enzymes du métabolisme des œstrogènes en période périnatale chez l'homme, le rat et la souris.

Les variations d'expression sont indiquées par rapport à l'expression chez l'adulte. * indique que la variation mentionnée concerne l'activité et non les ARNm.

En 2008, de Zwart *et al.* se sont intéressés à la mise en place du système de métabolisation dans le foie et le rein de rats mâles et femelles entre 21 jpc et 42 jpn. Ils ont analysés les profils d'expression de 7 Cyp450 (phase I) et 14 transporteurs (phase III) (de Zwart *et al.*, 2008). Il a été mis en évidence que 2 des 5 Cyp dont l'expression a été analysée par PCR quantitative sont très peu exprimés chez l'animal fœtal et/ou néonatal. Les 3 autres sont plus exprimés chez l'animal immature que chez l'adulte. En revanche, l'activité des Cyp est largement réduite chez l'animal fœtal et/ou néonatal, malgré l'éventuelle augmentation de l'expression des ARNm. Par ailleurs, l'activité enzymatique comme l'expression des ARNm peut présenter des disparités selon le sexe. Par exemple l'expression des ARNm du Cyp4a1 est équivalente chez les 2 sexes à 21 jpc mais l'activité est forte chez la femelle et faible chez le mâle. Sur les 14 transporteurs analysés dans le foie dans cette même étude, 6 sont faiblement exprimés chez l'animal fœtal et/ou néonatal et 7 autres présentent leur expression la plus forte entre 21 jpc et 7 jpn. Ces mêmes transporteurs ont été analysés dans le rein. L'un d'eux est d'ailleurs spécifique de cet organe, il n'a pas été détecté dans le foie. La répartition des prédominances d'expression chez l'animal fœtal/néonatal et mature est globalement la même que dans le foie mais certains gènes suivent des évolutions contraires au sein de ces 2 organes : par exemple Oatp1a4 est faiblement exprimés dans le foie fœtal et néonatal alors que c'est à ces âges que son expression est la plus forte dans le rein. À l'inverse, Oat3 est fortement exprimé dans le foie fœtal et néonatal mais faiblement exprimé dans le rein à ces âges. L'équipement métabolique est donc variable au cours du temps et ces variations peuvent être différentes selon l'organe considéré et bien sûr selon le sexe de l'individu étudié.

Au vu de toutes ces données, il semble essentiel de tenir compte de l'état de maturation du système métabolique dans chaque modèle utilisé. Le système de métabolisation des œstrogènes étant lui aussi évolutif au cours de la vie, une partie des enzymes concernées est présentée dans le tableau 9. Ce tableau récapitule les variations d'expression des enzymes par rapport à leur expression à l'âge adulte. Parmi les enzymes de phase I étudiées, Cyp1a2 semble être très peu exprimée en période périnatale chez les 3 espèces considérées. L'expression de Cyp1a1 est controversée chez le rat : rapportée comme augmentée en période périnatale (de Zwart *et al.*, 2008) ou au contraire diminuée (Lui *et al.*, 2010). Cyp 2b1/2 semblent très exprimés en période néonatale. En revanche, leur activité est extrêmement faible. En phase II, les COMT sont très peu exprimés chez les rongeurs. L'expression de GST par les nouveau-nés pourrait présenter des différences inter-espèces : augmentée chez l'homme, diminuée chez la souris. Les UGT sont généralement très peu exprimées voire absentes chez l'homme et les rongeurs. L'expression de Sult1a1 en période périnatale semble dépendre de l'espèce : diminuée chez l'homme, augmentée chez la souris (à l'inverse des GST). Par ailleurs, Runge-Morris, 1997 a montré que chez le rat mâle, le taux hépatique de Sult1e1, faible à la naissance, augmente entre la puberté et la maturité pour ensuite diminuer jusqu'à la sénescence de l'animal. Parmi les enzymes de phase III, Bcrp, Pgp et Mrp3 présentent des variations d'expression

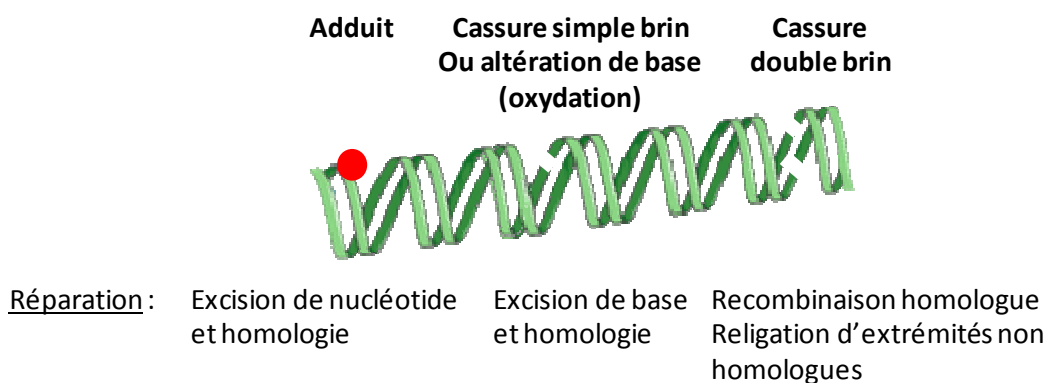


Figure 32 : Atteintes génotoxiques de l'ADN et mécanismes de réparation.

Les adduits sont formés par des molécules capables de se fixer sur la molécule d'ADN par liaison chimique avec les bases azotée. Leur réparation implique l'excision du nucléotide concerné et utilise le second brin d'ADN comme matrice pour combler la lésion. Les cassures simple brin et les oxydation de bases induisent le même mécanisme de réparation : seule la base est excisée et remplacée par complémentarité avec le brin non lésé. Les cassures double brin en revanche font appel à 2 mécanismes distincts : la recombinaison grâce au brin complémentaire si les 2 brins ne sont pas coupés exactement au même endroit ou la religation d'extrémités non homologues.

D'après Rass *et al.*, 2012.

dépendantes de l'espèce. Cependant la majorité des enzymes considérées sont peu exprimées en période périnatale contrairement à l'âge adulte. Seule 1 enzyme de phase II (Sult1a3, chez l'homme) semble plus fortement exprimée à cette période, ainsi que quelques transporteurs (Mrp1, Oat3, Mrp4 ou Oatp1b2). Ceci laisse supposer que le système de détoxification des œstrogènes est globalement immature à la naissance et ne se met en place que progressivement. Par ailleurs, les sulfatases sont très exprimées à cet âge. Ces enzymes effectuent l'action inverse des sulfotransférases : elles clivent les groupements sulfates, réduisant ainsi l'efficacité de la sulfoconjugaison. En revanche, la 17 β HSD2, en charge de la conversion de E2 en E1, est fortement exprimée.

De plus, le traitement par différentes molécules au cours de la période de mise en place du système enzymatique de détoxification peut engendrer des conséquences à long terme, comme une « empreinte enzymatique ». C'est le cas par exemple de l'administration néonatale de DES, induisant une « féminisation » du système des Cyp chez le rat mâle. Cette féminisation consiste en l'abolition de la surexpression de ces enzymes chez le mâle (Lucier *et al.*, 1979). Le DES est une molécule capable d'interférer dans le système hormonal d'un individu.

5. ATTEINTES DE L'ADN

A. Adduits et cassures

L'E2 est connu pour ses propriétés génotoxiques liées à sa bioactivation : les métabolites qui en sont issus sont plus réactifs que le 17 β -œstradiol lui-même. Les lésions induites par l'E2 (figure 32) sont de 2 types :

- **les adduits** : les 3,4-quinones (voir figure 28, page 86) sont capables de former des adduits à l'ADN en se liant de façon covalente sur la base azotée des nucléotides (Yager & Liehr, 1996; Parl *et al.*, 2009; Cavalieri *et al.*, 2000). Ces adduits génèrent des erreurs de réplication et transcription qui peuvent être à l'origine de cancers (Cavalieri *et al.*, 1997).

L'E2 et ses dérivés très réactifs peuvent être à l'origine d'adduits sur tous les types de bases azotées composant l'ADN : Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine (Akanni & Abul-Hajj, 1997). Ces adduits entraînent soit la perte de la base concernée soit la formation d'un adduit chimiquement stable perturbant les mécanismes cellulaires (Akanni & Abul-Hajj, 1997).

- **Les cassures et altérations des bases** : la conversion semiquinone / quinone (voir figure 28, page 86) fait intervenir une réductase qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO réagissent avec les doubles liaisons présentes sur les cycles des bases constituant l'ADN. Selon la puissance de l'ERO, toutes les bases peuvent être touchées (espèces les plus réactives) mais le plus souvent, la base touchée est la guanine, la plus facilement oxydable (Kawanishi *et al.*, 2001). La génération d'ERO par l'E2 peut aboutir à l'altération des bases puriques des nucléotides (cas des 2,3-quinones) ou des cassures de l'ADN (Han & Liehr, 1994). L'altération des bases peut à son tour entraîner leur substitution ou leur perte et le décalage du cadre de lecture (Turker, 2000). Les cassures de l'ADN peuvent provoquer des recombinaisons ou translocations voire la perte d'un morceau de chromosome (clastogénèse) (Turker, 2000).

		Rat	Souris	Chèvre	Composé testé	Expression	Variation	Référence
Ovaire	foetal	x			E2, EE, BPA		↘	Naciff <i>et al.</i> , 2002
	immature (25 jpn)	x	x			constitutive		Muskhelishvili <i>et al.</i> , 2002
	immature (25 jpn)	x			b-NF + E2		↗	Busmann <i>et al.</i> , 2006
	adulte	x	x			constitutive		Muskhelishvili <i>et al.</i> , 2002
	adulte (> 60 jpn)		x		E2	constitutive	↗	Symonds <i>et al.</i> , 2006

Testicule	néonatal	x	x		EB	constitutive	↘	Leung <i>et al.</i> , 2009, Deb <i>et al.</i> , 2011
	pubère	x	x		EB			
	adulte	x	x		EB			

Foie	♂ néonatal	x			i-3-C	-	-	Larsen-Su & Williams, 2001
	♂ adulte	x			PCB 180	constitutive	-	Roos <i>et al.</i> , 2011
	♀ néonatale	x			i-3-C	inductible	↗	Larsen-Su & Williams, 2001
	♀ néonatale			x		constitutive		Eltom & Schwark, 1999
	♀ adulte			x		constitutive		Eltom & Schwark, 1999
		x			PCB 180	constitutive	+/- ↗	Roos <i>et al.</i> , 2011
			x		déoxymiroestrol	constitutive	↗	Udomsuk <i>et al.</i> , 2011

Tableau 10 : Variation d'expression de Cyp1b1 : 3 espèces, 3 tranches d'âge, 3 organes. b-NF = b-naphtoflavone ; I-3-C indole 3 carbinole ; PCB : polychlorobiphényle

Les cassures de l'ADN peuvent concerner un seul des 2 brins de la molécule (« cassure simple brin ») ou les 2 (« cassure double brin »). Les cassures double brin sont les plus nocives pour la cellule car leur réparation ne peut faire systématiquement appel à l'homologie entre les 2 brins (pour revue, *Rass et al.*, 2012). Leur mode de réparation est donc moins fidèle que les réparations de lésions simple brin. L'E2 (via ses métabolites et les ERO qui en résultent) peut induire à la fois des cassures double brin (*Williamson & Lees-Miller*, 2011) et des cassures simple brin (*Rajapakse et al.*, 2005).

L'intégrité de l'ADN est constamment surveillée au sein de la cellule. Les anomalies sont aussitôt prises en charge par les systèmes de réparation qui arrêtent le cycle cellulaire le temps de la restauration des sites endommagés. Cependant ces systèmes sont saturables (*Ahmed & Setlow*, 1979, *Wheeler & Nelson*, 1987). Si les lésions sont trop importantes et les systèmes de réparation saturés, la cellule peut alors entrer en apoptose (pour revue, *Rass et al.*, 2012).

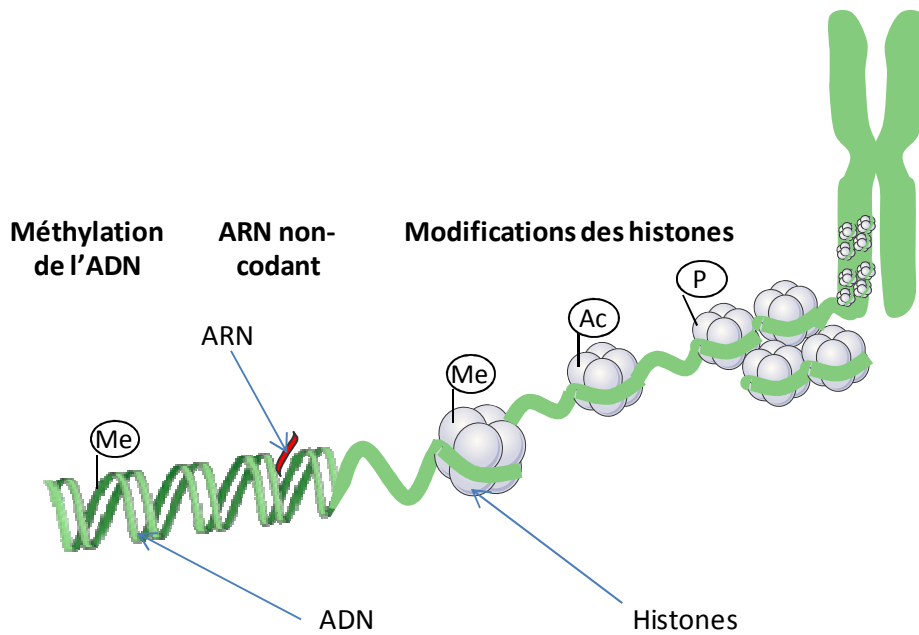
Dans l'ovaire, le lien entre lésions de l'ADN et insuffisance ovarienne précoce a été démontré chez des patientes souffrant du syndrome de Nimègue : les personnes atteintes de ce syndrome ont une déficience en protéine NBS1 impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN (*Chrzanowska et al.*, 2010).

Bien que la plus grande part des conversions des œstrogènes emprunte la voie des 2-hydroxyestradiol, la voie la plus dangereuse est celle des 4-hydroxyestradiol parce que les quinones générées sont plus réactives sur l'ADN que celles issues de la voie des 2-hydroxyestradiol (*Zahid et al.*, 2006). Cyp1b1, le cytochrome à l'origine de la production des 3,4-quinones générant des ERO et le plus d'adduits à l'ADN est donc un acteur important du métabolisme des œstrogènes. Il est par ailleurs exprimé de façon constitutive dans l'ovaire par les ovocytes (*Muskhelishvili et al.*, 2002). Toutefois, l'expression et la réponse de cette enzyme aux stimuli externes varient selon l'espèce, l'âge, le sexe et l'organe testé (tableau 10). Dans la gonade, Cyp1b1 semble exprimé de façon constitutive à tout âge chez le rongeur. Cependant les composés à activité œstrogénique ont une influence différente : diminution de l'expression à tout âge dans le testicule, diminution également dans l'ovaire fœtal mais augmentation dans l'ovaire immature et adulte. Dans le foie néonatal, Cyp1b1 n'est pas constitutivement exprimé chez les rongeurs mais l'est chez la chèvre. Seule la femelle voit une induction de l'expression suite au traitement par un composé œstrogénique. Chez l'adulte l'expression semble constitutive dans les 2 sexes et chez les 3 espèces considérées. Toutefois elle n'est pas modifiée par un traitement avec un composé œstrogénique chez le mâle, contrairement à la femelle.

B. Altérations épigénétiques

Depuis son introduction par Waddington dans les années 40, la définition du terme « épigénétique » a beaucoup évolué. La définition actuellement communément admise est le « changement de

A



B

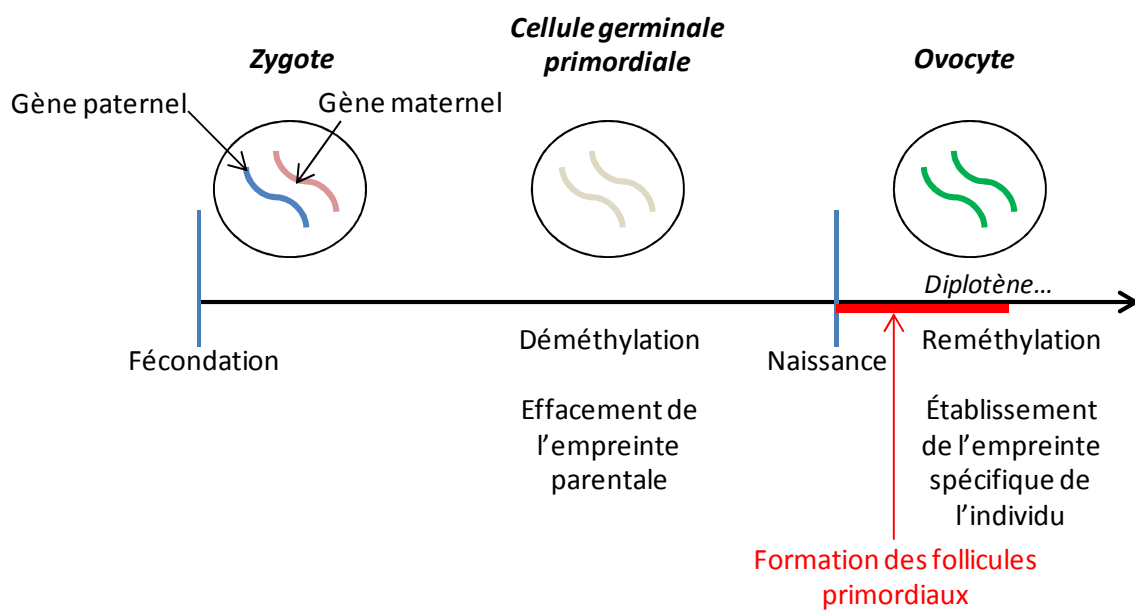


Figure 33 : Établissement des marques épigénétiques.

A : Les différentes marques épigénétiques : L'ADN peut être directement méthylé (Me) ou masqué par des ARN non codants. Le double brin d'ADN s'enroule autour des histones, lesquelles sont également concernées par les marques épigénétiques par méthylation (Me), acétylation (Ac) ou phosphorylation (P).

B : Empreintes épigénétiques chez la souris femelle : Le futur individu porte d'abord des empreintes essentielles transmises par ses parents. Puis ces empreintes parentales sont effacées dans les cellules germinales primordiales afin que le nouvel individu mette progressivement en place par méthylation sa propre empreinte qu'il sera à son tour capable de transmettre à sa descendance.

l'expression des gènes intervenant chez un organisme et l'héritabilité mitotique et méiotique de ce changement d'expression sans altération de la séquence d'ADN » (Holliday, 1994). Trois grands mécanismes épigénétiques sont connus : la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, phosphorylation et méthylation) et les ARN non-codants (figure 33 A). Les marques épigénétiques sont de 2 types :

- **Les marques ponctuelles parsemant l'ADN :**

Ces marques confèrent à chaque type cellulaire sa spécificité et leur effacement conduit à une différenciation des cellules (pour revue, Li, 2002). Le remodelage de ces marques intervient dans de nombreux processus pathologiques (par exemple le cancer du poumon : Jakopovic *et al.*, 2013; l'autisme : pour revue, Mbadiwe & Millis, 2013; les maladies neurodégénératives et notamment Alzheimer : Veerappan *et al.*, 2013).

Un traitement à l'œstradiol est capable de modifier des événements épigénétiques. Ainsi, dans l'hypothalamus, il modifie les histones, conduisant à l'altération de l'expression des récepteurs des œstrogènes et de la progestérone (Gagnidze *et al.*, 2013). Les œstrogènes modifient aussi les capacités de mémorisation via des mécanismes épigénétiques (Zhao *et al.*, 2010 ; Frick *et al.*, 2011).

- **Les empreintes :**

Pour la plupart des gènes, les 2 allèles portés par l'individu (1 allèle d'origine maternelle, 1 allèle d'origine paternelle) s'expriment. Mais il existe un petit nombre de gènes qui ne sont exprimés que via l'allèle maternel ou paternel. On dit que l'allèle non exprimé est soumis à empreinte. Cette empreinte issue de chaque parent est nécessaire au développement de l'embryon dès la fécondation (Surani *et al.*, 1984).

L'empreinte (maternelle et paternelle) s'établit précocement au cours de la vie des parents pendant la gamétogenèse (Surani *et al.*, 1984) (figure 33 B). Après la fécondation, le zygote se développe et l'empreinte parentale s'efface par déméthylation dans les cellules germinales primordiales (Szabo & Mann, 1995). L'animal met ensuite en place ses propres empreintes épigénétiques pendant la gamétogenèse pour les transmettre à son tour. Dans l'ovocyte, ce phénomène a lieu après le stade pachytène, au cours du stade diplotène, pendant la transition du follicule primordial au follicule antral (McGee *et al.*, 1997 ; Obata & Kono, 2002). L'empreinte s'établit progressivement sur les différents gènes concernés sous l'influence d'une méthyltransférase (Dnmt3) et de ses cofacteurs dont la concentration augmente à mesure que l'ovocyte grossit au cours de son développement (Anckaert *et al.*, 2013, Lucifero *et al.*, 2004).

Ce processus d'empreinte est sensible aux perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique qui peuvent modifier la méthylation de l'ADN et donc reprogrammer l'empreinte épigénétique (Anway *et al.*, 2005 ; Allegrucci *et al.*, 2005). Dans la gonade, une atteinte au moment de l'établissement de l'empreinte épigénétique (soit entre les stades « follicule primordial » et « antral ») peut dès lors être durable et transmissible, affectant le développement de l'embryon à venir ainsi que sa fertilité (Anway *et al.*, 2005). Ainsi un traitement par du BPA administré pendant les derniers stades du développement folliculaire et au début de la gestation provoque chez des souris l'altération du degré de méthylation des gènes soumis à empreinte chez les fœtus et également dans le placenta (Susiarjo *et al.*, 2013).

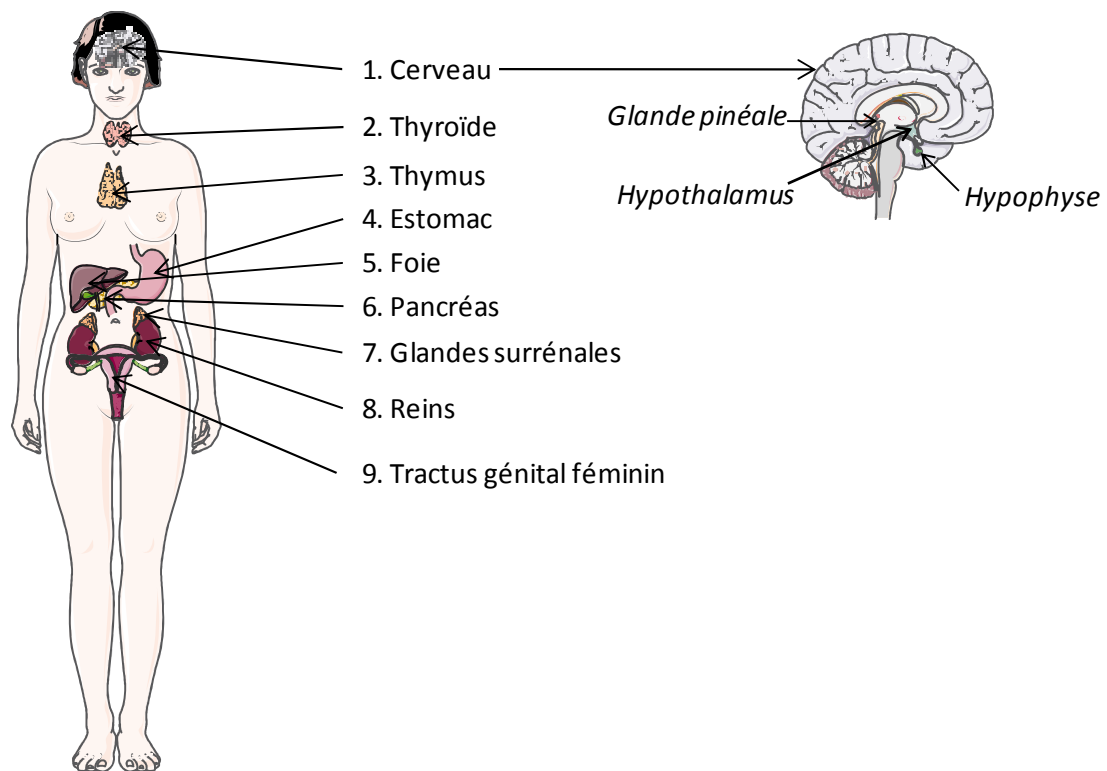


Figure 34 : Le système endocrinien humain féminin.

De nombreuses fonctions sont régulées de façon endocrine. La production des hormones est assurée par de nombreux organes.

III. Les perturbateurs endocriniens

1. LE SYSTÈME ENDOCRINIEN ET SES PERTURBATEURS

Le système endocrinien d'un individu (figure 34) est composé d'un ensemble de glandes (ou organes mixtes possédant une activité sécrétrice) sécrétant dans la circulation sanguine systémique des hormones, messagers chimiques capables de moduler l'activité et la fonction de divers organes. Les rôles des hormones sont extrêmement variés, allant de la gestion du rythme nyctéméral (glande pinéale ou épiphyse) à la stimulation du système immunitaire (thymus) en passant par la régulation du métabolisme (thyroïde, foie, pancréas), de la pression sanguine et de l'homéostasie (foie, rein), de la fonction digestive (estomac) et bien sûr la fonction de reproduction. La régulation de la fonction ovarienne et reproductive est assurée grâce à la collaboration de 3 sites présentés sur la figure : le cerveau (1), les glandes surrénales (7) et le tractus génital féminin (9). Ce dernier comprend bien sûr les ovaires mais aussi l'utérus et le placenta, dotés d'activités endocrines pendant la grossesse. Chez l'homme, les organes reproducteurs à fonction endocrine sont les testicules. Ils assurent la production d'androgènes, inhibines et activines sous la dépendance de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Les hormones, libérées dans le flux sanguin, atteignent leurs organes-cibles où elles agissent en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques. Certaines molécules exogènes pénétrant dans l'organisme ont la capacité d'interférer dans l'équilibre hormonal des individus, agissant alors comme des perturbateurs endocriniens. En 1996, suite à l'organisation d'un colloque par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (*United States Environmental Protection Agency*), une définition de ces perturbateurs endocriniens est proposée : « *un agent exogène interférant avec la sécrétion, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables au sein d'un organisme de l'homéostasie et la régulation de processus de développement* » (Kavlock *et al.*, 1996). Afin de la rendre transposable dans un cadre réglementaire, cette définition a été revue : « *un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange de substances qui altère la fonction du système endocrine, causant des effets délétères à un organisme intact, ses descendants ou sous-populations* ».

2. HISTORIQUE

Les premières observations de perturbations des fonctions endocrines remontent aux années 40, bien avant que le terme même de perturbateur endocrinien ne soit adopté et généralisé. En 1946, Bennetts et ses collaborateurs observent des problèmes d'infertilité et de chaleur persistantes chez des brebis et font le lien avec leur alimentation très riche en trèfle, importante source d'isoflavones (Bennetts *et al.*, 1946). Ce n'est que quelques années plus tard que le caractère œstrogénique des isoflavones sera découvert et identifié comme étant la cause des dysfonctionnements de la fonction de reproduction constatés chez les espèces d'élevage laissées au pré (pour revue, Samuel, 1967).

Ces observations sont liées à des substances naturellement présentes dans notre environnement. Mais l'essor de l'industrie a multiplié les sources de contaminants actifs sur le système hormonal. Ainsi en 1950, Burlington & Lindeman rapportent les effets « féminisants » du DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), un pesticide, sur des coqs. Exposés expérimentalement à cette substance, les coqs développaient des caractères sexuels secondaires réduits et leurs testicules, dont la structure tissulaire présentait une complète désorganisation, étaient cinq fois plus petits que ceux des animaux témoins (Burlington & Lindeman, 1950). Là encore, le potentiel œstrogénique du DDT est mis en cause. Puis les observations de la faune sauvage soumise à des pollutions environnementales accidentelles d'origine anthropique se multiplient. Au Canada, la présence de DDT et PCB (polychlorobiphényles) sur les sites de nidification de fous de bassan a induit la diminution du nombre d'œufs fécondés et l'amincissement de leurs coquilles. Ces effets délétères disparurent suite aux restrictions d'utilisation du DDT et des PCB (Elliott *et al.*, 1988). En 1994, une équipe de Floride relève des anomalies du développement chez des alligators vivant dans un lac à proximité d'un site de stockage de déchets chimiques (et notamment de DDT). Ainsi les femelles présentaient une augmentation de leurs niveaux d'E2 circulants et des anomalies ovariennes (MOF et ovocytes polynucléés). Les taux de testostérone chez les mâles étaient anormalement bas, leur tissu testiculaire désorganisé et la taille de leur pénis fortement réduite (Guillette *et al.*, 1994). Des anomalies furent également constatées chez des huîtres de la baie d'Arcachon (Alzieu *et al.*, 1986) puis chez des gastéropodes marins accidentellement exposés au TBT (tributhylétain), substance utilisée comme revêtement protecteur sur les coques de bateaux. Les femelles développaient des caractères sexuels mâles, phénomène connu sous le nom d'imposex, à cause des effets androgéniques du TBT provoqués par l'inhibition de l'aromatase (Folsvik *et al.*, 1999).

Mais le système reproducteur n'est pas le seul touché par les perturbateurs endocriniens. Ainsi la présence d'une pollution aux PCB sur les sites de reproduction des phoques gris de la mer Baltique a induit chez eux, en plus de malformations utérines, des malformations osseuses et une altération de la fonction thyroïdienne (pour revue, Jenssen, 1996).

L'espèce humaine n'est pas épargnée par les perturbateurs endocriniens. Dans les années 70 éclate le scandale du diéthylstilbestrol (DES). Le DES, œstrogène de synthèse produit pour la première fois en 1938, était à l'origine utilisé dans le traitement de certaines maladies sexuellement transmissibles et comme hormone de remplacement pour traiter les symptômes liés à la ménopause ou les cancers prostatiques métastatiques. Dans les années 40, il a commencé à être prescrit, aux États-Unis et dans plusieurs pays européens, dans le cadre de grossesses à risques pour prévenir les avortements spontanés (Karnaky, 1951). Dès 1953, l'efficacité de ce traitement est fortement remise en question (Dieckmann *et al.*, 1953) mais les prescriptions se poursuivent. En 1971, une étude établit un lien de cause à effet entre la prise de DES au cours de la grossesse et la survenue très précoce (autour de 20 ans) chez les jeunes filles nées de ces grossesses d'un cancer rare : l'adénocarcinome vaginal (Herbst *et al.*, 1971). Suite à ces révélations, la *Food and Drug Administration* (FDA, équivalent américain de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé française) déclare la prescription de DES contre-indiquée chez la femme enceinte. Le cancer vaginal n'est pas la seule

conséquence de l'exposition au DES *in utero* : la survenue de puberté précoce (pour revue, Roy *et al.*, 2009), l'augmentation de l'incidence du SOPK (pour revue, Crain *et al.*, 2008) et même l'infertilité (Palmer *et al.*, 2001) ont été corrélées au potentiel œstrogénique de cette molécule. D'autres perturbateurs endocriniens possédant les mêmes propriétés œstrogéniques (DDT, PCB, BPA) sont également impliqués dans la survenue de diverses perturbations de la fonction reproductive (pour revue, Roy *et al.*, 2009; Crain *et al.*, 2008).

3. TYPES DE MOLÉCULES ET VOIES D'EXPOSITION

Les perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique peuvent être classés selon leur origine :

- Anthropique
 - Volontaires

Certains perturbateurs endocriniens ont été synthétisés précisément dans le but de moduler des fonctions endocrines. C'est le cas du DES, des anti-cancéreux utilisés dans le traitement de cancers hormono-dépendants (tamoxifène, raloxifène) ou des contraceptifs / abortifs (EE, RU486).

- Involontaires

Beaucoup sont issus de l'industrie et sont synthétisés pour leurs propriétés tout autres que d'ordre endocrine. C'est le cas de nombreux pesticides (DDT, dieldrine, TBT, méthoxychlore, chlordécone...), de sous-produits intervenant dans les chaînes de synthèse (TCDD), de plastifiants (BPA, phtalates), de conservateurs dans les aliments ou cosmétiques (parabènes), de produits dérivés du pétrole utilisés à des fins énergétiques (huiles), d'isolants électriques (PCB), de métaux lourds (mercure, plomb, cadmium, cuivre) ou encore de retardateurs de flammes (PBDE). Leurs effets sont d'autant plus importants que ces substances sont souvent extrêmement stables, persistantes dans l'environnement et bioaccumulables tout au long de la chaîne alimentaire.

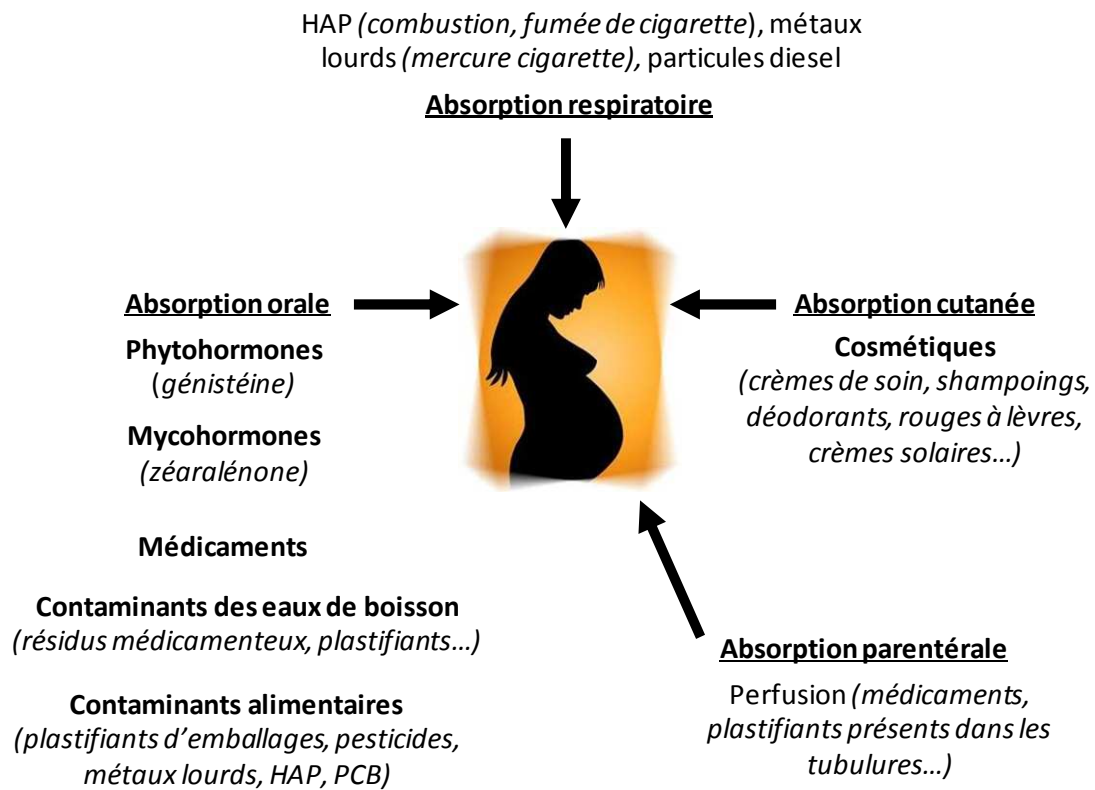


Figure 35 : Différentes voies d'absorption des xénobiotiques.

Un individu peut être exposé de multiples façons aux xénobiotiques. Il peut notamment être exposé de façon indirecte *in utero* pendant son développement.

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

PCB : polychlorobiphenyls

- Naturelle
 - Phytohormones

Les phytohormones sont des substances produites par les plantes mais capables d'interférer dans le système endocrinien d'autres espèces. C'est le cas par exemple de la génistéine et daidzéine du soja, de la biochanine A du trèfle ou de la réglisse.

- Mycohormones

Les mycohormones sont des types particuliers de toxines produites par des champignons. La plus connue est la zéaralénone, produite par la famille des *Fusarium* qui se développent sur les graines de céréales et peuvent ainsi par exemple contaminer le pain.

- Produits de combustion

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP, exemple : benzo(a)pyrène) sont produits notamment pendant les feux de forêts ou les éruptions volcaniques. Les HAP peuvent aussi dériver de processus anthropiques tels que l'incinération des déchets. Les particules issues de la combustion de carburant (diesel) entrent également dans cette catégorie.

Un organisme peut être soumis de plusieurs façons à ces divers perturbateurs endocriniens (figure 35) soit de façon directe, soit de façon indirecte *in utero*. Les voies d'absorption parentérale et respiratoire sont anecdotiques en ce qui concerne les perturbateurs endocriniens. Il convient toutefois de rappeler que le BPA et les phtalates sont d'importants composants des tubulures et poches de perfusion, matériel fréquemment utilisé dans les unités de soins néonataux, faisant des nourrissons concernés des cibles pour ces perturbateurs endocriniens (pour revue, Sattler *et al.*, 2012 ; Duty *et al.*, 2013). Les voies majoritaires sont les voies orales et cutanées. Les phytohormones et mycohormones sont ingérées avec notre alimentation, tout comme les pesticides présents sur les fruits et légumes (Bouvier *et al.*, 2005; Guldner *et al.*, 2010; Benbrook, 2002). C'est également le cas des HAP, très présents dans les légumes et la viande (mais peu dans l'eau à cause de leur faible hydrosolubilité) (Hattemer-Frey & Travis, 1991). L'exposition à des métaux lourds par ingestion de fruits, légumes, poissons et fruits de mer contaminés a fait l'objet d'études épidémiologiques. Par exemple l'absorption de cadmium, dont les propriétés œstrogéniques ont été expérimentalement démontrées (Johnson *et al.*, 2003), a été corrélée à une augmentation de l'incidence du cancer du sein (Julin *et al.*, 2012). Le conditionnement des aliments est également une importante source de contamination par les perturbateurs endocriniens. En effet, le BPA et les phtalates sont utilisés dans les cannettes, boîtes de conserve, emballages en plastique ou biberons et sont capables de passer dans la boisson ou l'aliment qu'ils emballent (pour revue, Turner & Sharpe, 1997; Howdeshell *et al.*, 2003) exposant ainsi le consommateur. Les eaux de boisson sont également à l'origine de contaminations. En effet, les boissons conservées dans des récipients en plastique ou des cannettes peuvent contenir des perturbateurs endocriniens au même titre que les aliments emballés. L'absorption cutanée a lieu majoritairement via l'usage de cosmétiques. Il a en effet été démontré que l'utilisation de shampoing contenant des composés à activité œstrogénique induisait le développement très précoce (avant 2 ans) de caractères sexuels secondaires chez des fillettes

(Tiwary, 1998). Par ailleurs, certains ingrédients contenus dans les crèmes solaires ont fait la preuve de leur capacité à induire des modifications du système endocrinien (Schlumpf *et al.*, 2001). C'est également le cas des parabènes, utilisés comme conservateurs dans de nombreux cosmétiques (Chen *et al.*, 2007a).

4. MODE D'ACTION

Quand les perturbateurs endocriniens sont entrés dans l'organisme, ils passent dans la circulation systémique et leur action est liée à la présence de récepteurs sur les tissus cibles. Il était couramment admis que le potentiel toxique d'une molécule était lié à son affinité pour un type spécifique de récepteur (perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique et récepteurs des œstrogènes, perturbateurs endocriniens à activité androgénique et anti-androgénique et récepteur des androgènes, etc...). Toutefois il apparaît désormais que la toxicité de ces molécules s'exerce de façon plus complexe. Les perturbateurs endocriniens exercent leur faculté d'agonisme ou antagonisme sur un ou plusieurs récepteurs, par exemple un perturbateur endocrinien œstrogénique agit comme un agoniste des récepteurs des œstrogènes et un antagoniste des récepteurs des androgènes. C'est le cas de certaines particules issues de la combustion du diesel (Taneda *et al.*, 2004). Ils peuvent également stimuler l'expression de ces récepteurs, moduler l'expression des facteurs de transcription nécessaires à la liaison aux ERE (voir section « œstrogènes », figure 26, page 82), modifier la dynamique de synthèse / dégradation des récepteurs en inhibant la dégradation de ces récepteurs par le protéasome (induisant ainsi une hyperstimulation de la cellule), augmenter l'activité du récepteur en activant les cascades de réactions (via les kinases) ou en empêchant la fixation d'histones sur l'ADN, le rendant ainsi accessible et disponible pour la transcription (pour revue, Tabb & Blumberg, 2006).

5. ORIGINE PÉRINATALE DES PATHOLOGIES DE L'ADULTE

La découverte des conséquences de la prise de DES et d'autres études concernant les agents tératogènes connus chez l'homme ont conduit à la formulation d'une hypothèse de « période critique de sensibilité » du fœtus au cours du développement. En effet, les agents tératogènes, souvent d'origine infectieuse (virus de la rubéole ou toxoplasme) ou médicamenteuse, causent des malformations ou dysfonctionnements chez les fœtus ayant été exposés *in utero*. Ainsi la thalidomide, utilisée comme anti-nauséeux pendant les années 50, induisait des malformations des membres chez les fœtus exposés. Les dommages les plus importants apparaissaient suite à une exposition entre 27 et 43 jours de grossesse, période critique durant laquelle la sensibilité du fœtus à cette molécule était maximale (pour revue, Monie, 1963). Par ailleurs, le rôle essentiel des hormones pendant la vie embryonnaire est également un aspect bien connu du développement et a fait l'objet de nombreuses études. On peut ainsi citer les travaux de Jost qui établit en 1972 que la sécrétion de l'AMH au cours d'une « fenêtre temporelle précise » du développement fœtal induit la différenciation mâle du tractus génital mais aussi que les facteurs testiculaires induisent la différenciation mâle du cerveau, ceci n'étant perceptible que bien longtemps après, chez l'animal adulte (Jost, 1972). Ces notions de « période critique de sensibilité » et de « nécessité de signaux hormonaux » chez le fœtus ont conduit à la formulation du concept de « programmation » précoce

	Effet	Ratte	Souris
Œstrogènes « naturels » (GEN, ZEA, DAI)	Puberté avancée	2; 23; 24	35
	Cyclicité irrégulière	2; 39	
	Œstrus allongé		34; 35
	Hausse des comportements sexuels	20	
Ester d'œstradiol (EV, EC, EB)	Puberté avancée	1; 2; 9; 24; 43; 46	
	Cyclicité irrégulière	1; 45	
	Œstrus allongé / permanent	2; 39; 42; 46	
	Acyclicité	9	
	Infertilité	46	
	Inhibition des comportements sexuels	1	
Œstrogène de synthèse (faible) BPA	Puberté avancée	17	29; 34
	Cyclicité irrégulière	17	34
	Subfertilité	49	4
	Pas d'effet		35; 51
Œstrogène de synthèse (fort) DES	Puberté avancée	21; 30; 36; 54	35
	Cyclicité irrégulière	21; 30; 36	35
	Subfertilité / infertilité	36; 49	4; 27; 32
	Inhibition des comportements sexuels	10	

Tableau 11 : Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur la cyclicité et la fertilité chez la ratte et la souris.

- | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1: Adewale <i>et al.</i> , 2009 | 20: Kouki <i>et al.</i> , 2003 | 39: Patisaul <i>et al.</i> , 2009 |
| 2: Bateman & Patisaul, 2008 | 21: Kubo <i>et al.</i> , 2003 | 40: Pepling <i>et al.</i> , 2010 |
| 3: Branham <i>et al.</i> , 1988 | 22: Lenie <i>et al.</i> , 2008 | 41: Peretz <i>et al.</i> , 2011 |
| 4: Cabaton <i>et al.</i> , 2011 | 23: Lewis <i>et al.</i> , 2003 | 42: Peretz <i>et al.</i> , 2012 |
| 5: Cao <i>et al.</i> , 2012 | 24: Losa <i>et al.</i> , 2011 | 43: Pinilla <i>et al.</i> , 2002 |
| 6: Chao <i>et al.</i> , 2012 | 25: Marzona <i>et al.</i> , 2001 | 44: Rodriguez <i>et al.</i> , 2010 |
| 7: Chen <i>et al.</i> , 2007b | 26: Matagne <i>et al.</i> , 2004 | 45: Shiorta <i>et al.</i> , 2012 |
| 8: Choi <i>et al.</i> , 2001 | 27: McLachlan <i>et al.</i> , 1982 | 46: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2008 |
| 9: Cruz <i>et al.</i> , 2012 | 28: Monje <i>et al.</i> , 2007 | 47: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2011 |
| 10: Csaba <i>et al.</i> , 1986 | 29: Nah <i>et al.</i> , 2011 | 48: Susiarjo <i>et al.</i> , 2007 |
| 11: Hiyama <i>et al.</i> , 2011 | 30: Nass <i>et al.</i> , 1984 | 49: Varayoud <i>et al.</i> , 2011 |
| 12: Iguchi <i>et al.</i> , 1986 | 31: Navarro <i>et al.</i> , 2009 | 50: Williams <i>et al.</i> , 1989 |
| 13: Ikeda <i>et al.</i> , 2002 | 32: Newbold <i>et al.</i> , 1998 | 51: Xi <i>et al.</i> , 2011 |
| 14: Jefferson <i>et al.</i> , 2002 | 33: Newbold <i>et al.</i> , 2009 | 52: Xu <i>et al.</i> , 2002 |
| 15: Jefferson <i>et al.</i> , 2006 | 34: Nikaido <i>et al.</i> , 2004 | 53: Yamamoto <i>et al.</i> , 2003 |
| 16: Karavan & Pepling, 2012 | 35: Nikaido <i>et al.</i> , 2005 | 54: Yoshida <i>et al.</i> , 2011 |
| 17: Kato <i>et al.</i> , 2003 | 36: Ohta <i>et al.</i> , 2012 | 55: Zhang <i>et al.</i> , 2012b |
| 18: Kipp <i>et al.</i> , 2007 | 37: Orisaka <i>et al.</i> , 2009 | |
| 19: Kirigaya <i>et al.</i> , 2006 | 38: Patisaul <i>et al.</i> , 2006 | |

dont les effets perdurent à long terme (Lucas, 1991) : « *early stimulus or insult at a sensitive period, resulting in long-term consequences for function* ». Deux ans plus tard, alertée par l'augmentation de l'incidence des cancers testiculaires, de l'hypospadias (défaut de fermeture de l'urètre) et de la cryptorchidie (défaut de descente testiculaire), ainsi que par le déclin de la qualité spermatique, une équipe danoise fait l'hypothèse que ces dérèglements de la fonction reproductrice masculine seraient toutes liées entre elles et seraient les différents symptômes d'un syndrome qu'elle nomme « Syndrome de Dysgénésie Testiculaire » (SDT). Ce SDT serait dû à l'influence conjointe d'altérations génétiques et de facteurs environnementaux (dont les perturbateurs endocriniens à activité œstrogéniques) et trouverait son origine pendant une période critique de sensibilité du fœtus (Sharpe & Skakkebaek, 1993). Puis ce concept est repris et appliqué à la survenue du SOPK, impliquant non seulement la gonade mais aussi tout l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Davies & Norman, 2002).

6. DYSFONCTIONNEMENTS REPRODUCTIFS ET ŒSTROGÈNES

A. Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur les capacités de reproduction

Basées sur ce concept de programmation et d'origine précoce des troubles de l'adulte, de nombreuses études ont été menées sur des modèles de rongeurs (rats / souris) pour évaluer les effets des œstrogènes administrés en période périnatale sur la fonction de reproduction femelle et divers paramètres liés à cette fonction. Le tableau 11 synthétise les effets sur la puberté, la cyclicité et la fertilité d'une courte exposition aux œstrogènes par injection (entre 1 et 8 jours) au cours de la gestation ou pendant la première semaine post-natale. Les résultats sont présentés par catégories d'œstrogènes : les œstrogènes dits « naturels » que l'on rencontre dans notre alimentation et les œstrogènes de synthèse. Ceux-ci sont divisés en 3 groupes : les esters d'œstradiol qui sont des dérivés du 17 β -œstradiol (Estradiol Valerate, Estradiol Benzoate, Estradiol Cypionate), le BPA qui est un œstrogène de synthèse dit « faible » (car son affinité pour les récepteurs des œstrogènes ER α et ER β est 2000 fois plus faible que le 17 β -œstradiol endogène) et le DES, un œstrogène « fort » (car son affinité pour les récepteurs des œstrogènes est 5 fois supérieure à celle du 17 β -œstradiol) (Kuiper *et al.*, 1997). Toutes les molécules testées induisent des irrégularités du cycle, chez la ratte comme la souris. Les altérations de la fertilité dépendent du type de molécule incriminée. Les œstrogènes « forts » induisent une infertilité (esters d'œstradiol, DES), les « faibles » (BPA, œstrogènes naturels) induisent plutôt une subfertilité. Ceci dépend de la dose et de la durée d'exposition. Les mécanismes conduisant à l'infertilité sont également variables. Elle peut résulter d'une absence de conception (chez les femelles acycliques / anovulatoires) (Cruz *et al.*, 2012; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008) ou d'une incapacité à mener une gestation à terme, comme c'est le cas chez des souris femelles exposées à la génistéine (Jefferson *et al.*, 2005). Des modifications du comportement sexuel ont également été rapportées chez la ratte : une augmentation chez les animaux traités avec des œstrogènes « naturels » et une inhibition chez les animaux traités avec des œstrogènes plus forts. Deux études ne rapportent aucun effet sur la puberté et la cyclicité après une exposition au BPA. Mais dans l'une, le traitement des animaux n'a été initié qu'à 14 jpn, hors de la fenêtre critique de sensibilité de l'organisme (Nikaido *et al.*, 2005). Dans l'autre, si la cyclicité est normale, les animaux présentent d'autres altérations de la fonction de reproduction (Xi *et al.*, 2011).

	Œstrogènes « naturels » GEN, ZEA, DAI		17b-œstradiol E2		Ester d'œstradiol EV, EC, EB, EE		Œstrogène de synthèse (faible) BPA		Œstrogène de synthèse (fort) DES	
	RAT	SOURIS	RAT	SOURIS	RAT	SOURIS	RAT	SOURIS	RAT	SOURIS
MOF	24	14	12; 18		24	19			44	12; 18; 19
⊃ Fragmentation cordons	7; 14; 15		7; 40		16		44	16; 55	44	16
⊃ Ovo. totaux	15 (↗)		40 (↗)		46*; 47*		16 (↗)		18	
⊃ Foll. primordiaux	7		7				44; 53	6; 55		
↗ Foll. primaires							44; 53	6		
Altération du cycle cellulaire							42; 52			
Anomalies méiotiques							22; 48			
↗ Expression ER	14				13		6			
↗ Kystes			17		45; 47		17			
↗ Foll.atrétiques					9; 46; 47		42		53; 54	
⊃ Corps jaunes	20	34; 50	17; 20		1; 9; 45; 46		1; 17	34	34; 49	
Hormones ovariennes					E2 =: 9		↗ E2: 51 ⊃ E2, E1, T, P4: 41 ⊃ inh : 18		↘ T: 53 ↘ E2: 21 ↘ inh : 18	
⊃ Poids	20		17 (↗); 20	18	8; 43		17 (↗)	29	3; 36 18	
⊃ Volume					1		1	11		
Aspect polykystique					9; 46					

Tableau 12 : Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur l’ovaire chez la ratte et la souris.

Ovo : ovocytes ; Foll. : follicules.

Partie supérieure du tableau: les observations ont été réalisées chez l’animal néonatal ou immature (MOF) sauf indication contraire (* : observation chez l’animal adulte)

Partie inférieure : les observations ont été réalisées chez l’animal adulte [sauf 18 (19 jpn) ; 29 et 53 (péripubertaires)]

- | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1: Adewale <i>et al.</i> , 2009 | 20: Kouki <i>et al.</i> , 2003 | 39: Patisaul <i>et al.</i> , 2009 |
| 2: Bateman & Patisaul, 2008 | 21: Kubo <i>et al.</i> , 2003 | 40: Pepling <i>et al.</i> , 2010 |
| 3: Branham <i>et al.</i> , 1988 | 22: Lenie <i>et al.</i> , 2008 | 41: Peretz <i>et al.</i> , 2011 |
| 4: Cabaton <i>et al.</i> , 2011 | 23: Lewis <i>et al.</i> , 2003 | 42: Peretz <i>et al.</i> , 2012 |
| 5: Cao <i>et al.</i> , 2012 | 24: Losa <i>et al.</i> , 2011 | 43: Pinilla <i>et al.</i> , 2002 |
| 6: Chao <i>et al.</i> , 2012 | 25: Marzona <i>et al.</i> , 2001 | 44: Rodriguez <i>et al.</i> , 2010 |
| 7: Chen <i>et al.</i> , 2007b | 26: Matagne <i>et al.</i> , 2004 | 45: Shiorta <i>et al.</i> , 2012 |
| 8: Choi <i>et al.</i> , 2001 | 27: McLachlan <i>et al.</i> , 1982 | 46: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2008 |
| 9: Cruz <i>et al.</i> , 2012 | 28: Monje <i>et al.</i> , 2007 | 47: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2011 |
| 10: Csaba <i>et al.</i> , 1986 | 29: Nah <i>et al.</i> , 2011 | 48: Susiarjo <i>et al.</i> , 2007 |
| 11: Hiyama <i>et al.</i> , 2011 | 30: Nass <i>et al.</i> , 1984 | 49: Varayoud <i>et al.</i> , 2011 |
| 12: Iguchi <i>et al.</i> , 1986 | 31: Navarro <i>et al.</i> , 2009 | 50: Williams <i>et al.</i> , 1989 |
| 13: Ikeda <i>et al.</i> , 2002 | 32: Newbold <i>et al.</i> , 1998 | 51: Xi <i>et al.</i> , 2011 |
| 14: Jefferson <i>et al.</i> , 2002 | 33: Newbold <i>et al.</i> , 2009 | 52: Xu <i>et al.</i> , 2002 |
| 15: Jefferson <i>et al.</i> , 2006 | 34: Nikaido <i>et al.</i> , 2004 | 53: Yamamoto <i>et al.</i> , 2003 |
| 16: Karavan & Pepling, 2012 | 35: Nikaido <i>et al.</i> , 2005 | 54: Yoshida <i>et al.</i> , 2011 |
| 17: Kato <i>et al.</i> , 2003 | 36: Ohta <i>et al.</i> , 2012 | 55: Zhang <i>et al.</i> , 2012b |
| 18: Kipp <i>et al.</i> , 2007 | 37: Orisaka <i>et al.</i> , 2009 | |
| 19: Kirigaya <i>et al.</i> , 2006 | 38: Patisaul <i>et al.</i> , 2006 | |

Chez les primates, le DES administré en période péri-pubertaire induit également l'avancement de la puberté et des troubles de la cyclicité (Golub *et al.*, 2003). Des études épidémiologiques rapportent également l'avancée de la puberté en lien avec l'exposition à des PEO de synthèse (Roy *et al.*, 2009, Crain *et al.*, 2008) ou naturels (zéaralénone, Bandera *et al.*, 2011). Ces dysfonctionnements reproductifs peuvent trouver leur origine soit dans une atteinte ovarienne soit dans une atteinte centrale de l'hypophyse ou de l'hypothalamus.

B. Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur l'ovaire

L'ovaire peut être directement touché par l'exposition à des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique. Les atteintes ovariennes sont présentées dans le tableau 12 avec leurs références. En effet, la période couvrant les premiers jours après la naissance est critique pour l'histogenèse folliculaire et de multiples études chez les rongeurs décrivent une inhibition de la fragmentation des cordons ovariens lors de la formation des follicules, conduisant à la présence dans l'ovaire de petits amas d'ovocytes n'appartenant pas à des follicules correctement formés (*voir dans le tableau références 7, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 24, 44*). Les MOF qui peuvent résulter de ces anomalies de fragmentations sont généralement des structures transitoires éliminées chez les rongeurs plus ou moins rapidement avant la puberté. En revanche, la persistance de MOF à l'âge adulte a été observée dans les ovaires de macaques exposées *in utero* à des doses de BPA cohérentes avec les expositions humaines (Hunt *et al.*, 2012). La survie des ovocytes est également affectée par un traitement néonatal avec un PEO. Bien que deux études sur la souris exposée au BPA (Chen *et al.*, 2007b ; Xi *et al.*, 2011), et une étude sur le DES et le BPA chez le rat (Rodriguez *et al.*, 2010) ne rapportent pas d'effet sur le nombre d'ovocytes, chez les souris traitées les ovaires contiennent généralement plus d'ovocytes (*voir références 15, 16, 40*). Karavan & Pepling (2012) et Jefferson (2006) constatent que la survie ovocytaire dans leur modèle est liée à une réduction de l'apoptose qui touche les cellules germinales au cours de la formation des follicules, observation concordante avec celle de Marzona *et al.*, 2001. Chez la ratte il semblerait que les PEO induisent une baisse du nombre d'ovocytes (*voir références 18, 46, 47*). Toutefois, certaines études menées sur l'ovaire et ses follicules sous l'influence des PEO n'ont pas évalué la survie des cellules germinales mais le stade de développement des follicules au sein desquels elles sont incluses (Kezele & Skinner, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

Le devenir des follicules est influencé par l'exposition néonatale aux PEO : le BPA (Karavan & Pepling, 2012, Zhang *et al.*, 2012b), DES (Karavan & Pepling, 2012; Kim *et al.*, 2009), EE (Karavan & Pepling, 2012) et E2 (Karavan & Pepling, 2012, Kezele & Skinner, 2003) ralentissent la transition du stade primordial au stade primaire, voire du stade primaire au stade secondaire, affectant ainsi la dynamique de sortie de quiescence et de recrutement folliculaire. À 8 jpn, les ovaires de rattes traitées avec des parabènes contiennent plus de follicules primordiaux et moins de primaires, indiquant là aussi une baisse de l'entrée en croissance (Ahn *et al.*, 2012). Ceci est confirmé par la diminution de l'expression de Foxl2 (Ahn *et al.*, 2012) impliqué dans la transition du follicule primordial vers le stade primaire (Uhlenhaut & Treier, 2006). Toutefois, d'autres études (Rodriguez *et*

al., 2010, Yamamoto *et al.*, 2003, Chao *et al.*, 2012) rapportent au contraire une transition du stade primordial au stade primaire accélérée.

Dans cette dernière étude, la transition au stade primaire a lieu en dépit de l'immaturité méiotique des ovocytes. Au contraire, l'arrêt de la progression méiotique entraîne l'inhibition de la fragmentation des cordons puis de la transition vers le stade primaire dans les ovocytes de souris exposées *in utero* au BPA (Zhang *et al.*, 2012b). L'arrêt méiotique pourrait être un mécanisme de protection de l'ovocyte contre les anomalies de ségrégation des chromosomes (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2008). Des anomalies méiotiques suite à l'exposition périnatale à du BPA ont en effet été rapportées à plusieurs reprises chez la souris (Lenie *et al.*, 2008; Susiarjo *et al.*, 2007), chez le macaque exposé *in utero* (Hunt *et al.*, 2012) et dans l'espèce humaine sur des ovaires fœtaux en culture (Brieno-Enriquez *et al.*, 2011; Brieno-Enriquez *et al.*, 2012). Le cycle cellulaire est modifié par le BPA, notamment au moment de l'entrée en phase de réplication de l'ADN et lors de l'entrée en mitose (voir références 42 et 52). Des modifications du profil d'expression de gènes impliqués dans la mitose et la méiose ont également été constatées dans les ovaires de souris exposées *in utero* à du BPA, contribuant probablement à la réduction du nombre d'ovocytes totaux (Lawson *et al.*, 2011).

Les œstrogènes sont connus pour augmenter l'expression de leurs propres récepteurs dans différents tissus. Ainsi chez les souris femelles cyclées, quand l'œstradiol circulant augmente, l'expression des récepteurs augmente dans l'utérus. Chez les femelles ovariectomisées, un traitement avec des œstrogènes à des doses physiologiques induit la même augmentation contrairement aux doses supra-physiologiques (Bergman *et al.*, 1992). Chez les animaux traités précocement avec différents types d'œstrogènes (et notamment le BPA), on observe aussi l'augmentation de l'expression de ces récepteurs, mais cette hausse est transitoire : elle ne persiste pas jusqu'à l'âge adulte (Jefferson *et al.*, 2002). Elle peut toutefois accroître la sensibilité de l'ovaire au traitement.

Chez l'animal adulte, l'exposition néonatale aux PEO peut induire la survenue de follicules dépourvus de cellule germinale, des kystes pleins formés de cellules somatiques (voir références 17, 45, 47). La proportion de follicules en croissance atrétiques est également augmentée (voir références 9, 25, 46, 47, 53, 54). Le nombre de corps jaunes présents dans les ovaires des femelles traitées est réduit (voire nul), traduisant un défaut d'ovulation (voir références tableau 12 : 1 ; 9 ; 17 ; 20 ; 34 ; 50 ; 45 ; 46 ; 49). Ces corps jaunes étant la source principale de progestérone, les taux circulants de cette hormone ovarienne sont réduits (Peretz *et al.*, 2011). Peu d'informations sont disponibles sur la production d'hormones ovariennes après un traitement périnatal avec des PEO. La testostérone (références 41, 53) et l'inhibine (référence 18) semblent également en baisse. Les taux d'œstradiol en revanche sont plus contradictoires : stable chez le rat traité avec de l'EV ou en hausse chez la souris traitées avec du BPA (références 9 et 51, respectivement) mais en baisse chez d'autres souris traitées au BPA et des rattes traitées au DES (références 41 et 21, respectivement). L'étude rapportant une sécrétion stable de E2 (Cruz *et al.*, 2012) est basée sur un modèle d'ovaire en culture stimulé par de l'hCG et il est possible que cette stimulation compense la réduction du nombre de follicules antraux

(producteurs d'œstradiol) présents dans les ovaires. Le modèle utilisé au cours de l'étude rapportant une augmentation de la production d'E2 (Xi *et al.*, 2011) est une souris exposée au BPA depuis sa conception jusqu'à son sacrifice. La chronicité de l'exposition, certes couvrant la période néonatale qui fait l'objet de cette thèse, induit des effets différents de l'exposition aiguë ou sub-aiguë (moins de 2 semaines) et rend impossible l'étude de la persistance ou non des dommages causés par une exposition plus courte lors d'une période critique de sensibilité. Un modèle similaire (ratte exposée de façon chronique) a été utilisé dans l'étude rapportant une baisse de la sécrétion d'E2 (Kubo *et al.*, 2003). La baisse de la production d'E2 par les ovaires de souris exposées à du BPA (Peretz *et al.*, 2011) est à considérer avec prudence car il s'agit d'un modèle de culture organotypique d'ovaire pré-pubère. Il semble donc évident que le traitement par une hormone ou xénohormone affecte la production endogène d'hormones ovariennes mais ce point est assez peu documenté. L'expression de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse est cependant affectée (observation le lendemain du traitement : Ahn *et al.*, 2012; altérations persistantes à l'âge adulte : Ikeda *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2011).

Le poids de l'ovaire à l'âge adulte est souvent réduit par l'exposition précoce aux PEO (références 3, 8, 18, 29, 36, 43), tout comme le volume (références 1, 11, 54), probablement à cause de la déplétion folliculaire plus importante chez les animaux traités. Toutefois, le poids peut aussi augmenter (référence 17), peut-être à cause de la densité du tissu fibreux qui se développe dans l'organe à mesure que la réserve folliculaire diminue. Une étude (référence 25) rapporte l'augmentation du volume ovarien à 5 jpn après un traitement à l'EV. Le dernier critère observé et rapporté dans le tableau 12 est l'aspect polykystique des ovaires. Ceci est décrit chez les rongeurs (références 9, 46) mais aussi chez les macaques traités au DES (Golub *et al.*, 2003).

C. Conséquences d'une exposition néonatale aux PEO sur l'hypophyse et l'hypothalamus

L'ovaire appartient à l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et collabore avec l'hypothalamus et l'hypophyse qui peuvent également être la cible des PEO (tableau 13 A et B, avec références correspondantes). La période périnatale correspond là encore à une période critique de sensibilité aux composés œstrogéniques puisque c'est à ce moment que se met en place la « différenciation sexuelle » du cerveau. En effet, les récepteurs des gonadotropines se développent sur l'ovaire (Peluso *et al.*, 1976) pendant que l'hypophyse commence à sécréter des gonadotropines. Une perturbation de ce contexte endocrine fragile par l'injection d'EB le jour de la naissance inhibe les sécrétions de gonadotropines, induisant à l'âge adulte une atrophie ovarienne et la réduction de la FSH circulante (Pinilla *et al.*, 1993). La plupart des études concernant l'hypothalamus (A) et l'hypophyse (B) ont été menées chez le rat.

A : Hypothalamus		Effets	Références
Œstrogènes « naturels » (GEN, ZEA, DAI)		⊘ nombre de neurones kiss	2; 24 (effet transitoire)
		Expression des récepteurs des œstrogènes	pas d'effet : 38
Ester d'œstradiol (EV,EC,EB,EE)		⊘ nombre de neurones kiss	2; 5; 24; 31; 39
		↗ expression des neurotransmetteurs (sauf GABA)	47
		Expression des récepteurs des œstrogènes	⊘ ARNm : 37
Œstrogène de synthèse (faible) BPA		⊘ nombre de neurones kiss	pas d'effet : 5; 39 ⊘ (dose forte): 31; 39
		Expression des récepteurs des œstrogènes	↗ (à 21 jpn): 28 pas d'effet : 38
Œstrogène de synthèse (fort) DES		⊘ nombre de neurones kiss	Pas d'information
		Expression des récepteurs des œstrogènes	↗ (à 21 jpn) : 28
Œstradiol		↗ fréquence des pulses de GnRH	26

B : Hypophyse		Effets	Références
Ester d'œstradiol (EV,EC,EB,EE)		Expression des hormones hypophysaires	⊘ FSH & LH avant puberté : 31; 43 = LH adulte: 9
		↗ poids de l'hypophyse	pas d'effet : 45
Œstrogène de synthèse (faible) BPA		Expression des hormones hypophysaires	Pas d'effet : 21; 51 (souris)
Œstrogène de synthèse (fort) DES			↗ FSH :18; 53 = FSH :21 ↗ LH : 53 = LH : 18 (souris)
		↗ poids de l'hypophyse	36
Œstradiol			↗ FSH : 18 (souris) = LH : 18 (souris)
		Expression des hormones hypophysaires	⊘ LH : 26

Tableau 13 : Exposition périnatale à des composés à activité œstrogénique et conséquences sur l'hypothalamus (A) et l'hypophyse (B).

Les données présentées ont été collectées chez la ratte (sauf indication contraire).

- | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1: Adewale <i>et al.</i> , 2009 | 20: Kouki <i>et al.</i> , 2003 | 39: Patisaul <i>et al.</i> , 2009 |
| 2: Bateman & Patisaul, 2008 | 21: Kubo <i>et al.</i> , 2003 | 40: Pepling <i>et al.</i> , 2010 |
| 3: Branham <i>et al.</i> , 1988 | 22: Lenie <i>et al.</i> , 2008 | 41: Peretz <i>et al.</i> , 2011 |
| 4: Cabaton <i>et al.</i> , 2011 | 23: Lewis <i>et al.</i> , 2003 | 42: Peretz <i>et al.</i> , 2012 |
| 5: Cao <i>et al.</i> , 2012 | 24: Losa <i>et al.</i> , 2011 | 43: Pinilla <i>et al.</i> , 2002 |
| 6: Chao <i>et al.</i> , 2012 | 25: Marzona <i>et al.</i> , 2001 | 44: Rodriguez <i>et al.</i> , 2010 |
| 7: Chen <i>et al.</i> , 2007b | 26: Matagne <i>et al.</i> , 2004 | 45: Shiorta <i>et al.</i> , 2012 |
| 8: Choi <i>et al.</i> , 2001 | 27: McLachlan <i>et al.</i> , 1982 | 46: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2008 |
| 9: Cruz <i>et al.</i> , 2012 | 28: Monje <i>et al.</i> , 2007 | 47: Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2011 |
| 10: Csaba <i>et al.</i> , 1986 | 29: Nah <i>et al.</i> , 2011 | 48: Susiarjo <i>et al.</i> , 2007 |
| 11: Hiyama <i>et al.</i> , 2011 | 30: Nass <i>et al.</i> , 1984 | 49: Varayoud <i>et al.</i> , 2011 |
| 12: Iguchi <i>et al.</i> , 1986 | 31: Navarro <i>et al.</i> , 2009 | 50: Williams <i>et al.</i> , 1989 |
| 13: Ikeda <i>et al.</i> , 2002 | 32: Newbold <i>et al.</i> , 1998 | 51: Xi <i>et al.</i> , 2011 |
| 14: Jefferson <i>et al.</i> , 2002 | 33: Newbold <i>et al.</i> , 2009 | 52: Xu <i>et al.</i> , 2002 |
| 15: Jefferson <i>et al.</i> , 2006 | 34: Nikaido <i>et al.</i> , 2004 | 53: Yamamoto <i>et al.</i> , 2003 |
| 16: Karavan & Pepling, 2012 | 35: Nikaido <i>et al.</i> , 2005 | 54: Yoshida <i>et al.</i> , 2011 |
| 17: Kato <i>et al.</i> , 2003 | 36: Ohta <i>et al.</i> , 2012 | 55: Zhang <i>et al.</i> , 2012b |
| 18: Kipp <i>et al.</i> , 2007 | 37: Orisaka <i>et al.</i> , 2009 | |
| 19: Kirigaya <i>et al.</i> , 2006 | 38: Patisaul <i>et al.</i> , 2006 | |

Dans l'hypothalamus, l'effet le plus communément rapporté après une exposition néonatale à des PEO est la diminution du nombre de neurones kiss (*références 2, 24, 31, 39*). Toutefois, il arrive que cet effet soit seulement transitoire donc invisible à l'âge adulte (*référence 24*). Ceci pourrait expliquer pourquoi le BPA semble ne pas avoir d'effet (*références 5, 39*). À ma connaissance, il n'y a pas d'information disponible concernant les effets du DES sur le nombre de neurones kiss. Les effets des PEO sur l'expression des récepteurs des œstrogènes dans l'hypothalamus sont également variables : des variations (augmentations ou diminutions) ont été rapportées ainsi que l'absence d'effet mais là encore, l'éventuel caractère transitoire de ce paramètre et l'absence de données collectées à l'âge adulte rendent toute conclusion impossible. Par ailleurs, les esters d'œstradiol semblent influencer la sécrétion de neurotransmetteurs à l'âge adulte (augmentant les excitateurs et diminuant les inhibiteurs, *référence 47*) et *in vitro* l'E2 lui-même augmente la fréquence des pulses de GnRH (*référence 26*).

Les effets des PEO les plus fréquemment rapportés sur l'hypophyse sont des modifications de la sécrétion des gonadotropines. Toutefois, certaines études mentionnées dans le tableau 13 B ont été menées sur des animaux prépubères (*références 18; 31; 53*) ou des systèmes en culture (*référence 26*). Les études menées chez l'adulte (*références 9; 21; 51*) ne rapportent pas de modifications à long terme. Chez le rat mâle, les effets du DES administré en période néonatale sur les gonadotropines s'estompent avec l'âge (Martin *et al.*, 2009). Cependant il ne faut pas perdre de vue que les effets sur les gonadotropines, bien que disparaissant progressivement, s'exercent à une période critique du développement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Très peu d'études concernent les œstrogènes « naturels » tels que la génistéine, la zéaralénone ou la daidzéine et leurs effets sur les gonadotropines. Awoniyi *et al.* ne rapportent aucun effet de la génistéine chez le rat (Awoniyi *et al.*, 1998). Avec la même molécule, Medigovic *et al.* observent une augmentation du nombre de cellules gonadotropes à la suite d'un traitement à l'âge de 18 jpn (Medigovic *et al.*, 2012) et Faber & Hughes constatent une diminution de la LH circulante chez des rattees castrées adultes et traitées juste après la naissance. Ils observent la même chose avec la zéaralénone mais il ne s'agit pas d'un modèle en conditions physiologiques (Faber & Hughes, 1991). Une seule étude rapporte l'augmentation du poids de l'hypophyse après un traitement néonatal au DES (*référence 36*).

D. Facteurs influençant la gravité des conséquences d'une exposition néonatale aux PEO

Les effets des PEO dépendent de leur nature (faiblement ou fortement œstrogénique) mais surtout de la dose utilisée. Ainsi la sévérité du phénotype observé peut être directement corrélée à la dose administrée. Par exemple, plus la dose de DES est importante, plus la proportion de femelles présentant des irrégularités du cycle œstrien juste après la puberté est forte, plus l'infertilité des femelles survient tôt, plus le poids de l'ovaire à l'âge adulte diminue et plus le poids de l'hypophyse à l'âge adulte augmente (Ohta *et al.*, 2012). Mais il n'est pas rare dans le cas des perturbateurs endocriniens de rencontrer des effets contradictoires après exposition à une faible et une forte dose. Par exemple, la génistéine induit à 100 µg/jour une augmentation de la LH mais une diminution à 1000 µg/jour (Faber & Hughes, 1991). Le BPA induit à faible dose (0.1 mg/kg) une augmentation du poids corporel de rattees mais pas à forte dose (1.2 mg/kg) (Rubin & Soto, 2009). À 50 µg/kg, il induit

également une avancée de l'ouverture vaginale mais pas à 50 mg/kg (Adewale *et al.*, 2009). Une attention particulière doit donc être apportée aux faibles doses.

Par ailleurs, la fenêtre critique de sensibilité des ratteaux aux traitements par PEO semble assez courte : d'après une étude de Cruz *et al.*, (2012) une injection unique d'EV 10 mg/kg le jour de la naissance suffit à induire l'avancement de la puberté, une acyclicité, des modifications du nombre de follicules primaires chez l'adulte ainsi que l'augmentation de l'atréxie des follicules antraux et l'absence de corps jaune. La même injection à 6 jours provoque l'avancement de la puberté et l'acyclicité ainsi que l'absence de corps jaune mais n'induit pas de variation du nombre de follicules. Si l'administration survient à 13 jpn, le phénotype adulte est similaire à celui des animaux traités à 6 jpn. Si l'injection survient à 20 jpn, la puberté est avancée et la cyclicité est transitoirement irrégulière et à 29 jpn, le seul effet constaté est une irrégularité transitoire des cycles. La sévérité des phénotypes engendrés par un même traitement dépend donc directement de l'âge lors de ce traitement et résulte probablement de l'atteinte simultanée de tous les étages de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

En outre, l'ovaire, l'hypophyse et l'hypothalamus ne sont pas les seuls organes touchés par un traitement périnatal aux PEO. Ainsi, l'utérus, le vagin, l'oviducte et la glande mammaire peuvent être affectés (McLachlan *et al.*, 1982; Newbold *et al.*, 1998; Vandenberg *et al.*, 2008). Les récepteurs des œstrogènes étant très largement exprimés dans l'organisme, les PEO peuvent également agir sur des organes n'appartenant pas au système reproducteur. Ainsi le BPA modifie les fonctions de la barrière intestinale (en culture et *in vivo* chez le rat) et l'exposition périnatale induit chez la ratte une inflammation chronique (Braniste *et al.*, 2010). Le BPA agit aussi sur le tissu adipeux en réduisant l'expression de l'adiponectine qui participe à la régulation du métabolisme du glucose (Kidani *et al.*, 2010) et sur les poumons en augmentant la sensibilité allergique et l'inflammation bronchique chez la souris (Midoro-Horiuti *et al.*, 2010). L'exposition à du DES dans les premiers jours de la vie induit chez le rat des modifications osseuses persistant tout au long de la vie (Migliaccio *et al.*, 1995).

IV. Problématique et stratégie expérimentale

Il semble bien établi que lors de la naissance, l'animal s'affranchit du contexte endocrine maternel - notamment des œstrogènes- et que ceci est un facteur permissif pour la formation des follicules dans l'ovaire chez les rongeurs (Kezele & Skinner, 2003; Chen *et al.*, 2007b; Lei *et al.*, 2010). Dans un premier temps, nous avons cherché à mesurer cette décroissance œstrogénique physiologique mais aussi à mimer son absence en traitant des rattes avec des injections d'œstradiol, la molécule endogène, durant trois jours à partir de la naissance afin d'en caractériser les effets sur la formation des follicules chez la ratte (*Rattus Norvegicus*). La clairance de l'œstradiol a donc fait l'objet d'une étude dans le sang. Des enzymes de la métabolisation de cette molécule ont été étudiées dans le foie mais aussi dans l'ovaire, aussi bien pour améliorer notre connaissance du système physiologique de détoxification à cet âge que pour évaluer le système de défense métabolique mis en place suite à l'exposition à l'œstradiol. Comme de nombreux travaux l'ont déjà démontré, la quantité de cellules germinales décroît physiologiquement concomitamment avec la formation folliculaire (Beaumont & Mandl, 1962; Pepling & Spradling, 2001) et est aussi affectée par l'exposition à des composés œstrogéniques exogènes (Jefferson *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007b). Nous avons donc souhaité évaluer l'évolution physiologique et pathologique du nombre d'ovocytes entre la naissance et la fin du processus d'histogenèse folliculaire (à 3 jpn) d'une part par comptage des ovocytes suite à l'utilisation de différentes doses d'œstradiol, d'autre part par évaluation de l'apoptose, phénomène contribuant à la fragmentation des cordons ovariens (Pepling & Spradling, 2001). Le remodelage de la membrane basale accompagnant cette fragmentation (Rajah *et al.*, 1992) a également été étudié.

Nous montrons que l'animal immature acquiert rapidement la capacité d'éliminer l'œstradiol mais que le traitement induit malgré tout un ralentissement de l'acquisition de la maturité du système enzymatique à l'origine de cette détoxification. Il induit en outre une réduction dose-dépendante du nombre d'ovocytes présents dans l'ovaire et perturbe la formation folliculaire. En effet, des zones non fragmentées persistent à 3 jpn et l'apoptose frappe anormalement des ovocytes déjà enclos dans des follicules, conduisant à l'apparition de « follicules vides ». Ces résultats font l'objet d'un article publié dans la revue PLoS One.

Dans un second temps, les effets à long terme de l'œstrogénisation néonatale pendant la formation des follicules ovariens ont été évalués. Les effets d'une œstrogénisation sont souvent persistants à l'âge adulte, tant sur l'ovaire (Sotomayor-Zarate *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012) que sur les étages supérieurs de l'axe HHG (Bateman & Patisaul, 2008; Patisaul *et al.*, 2009). Nous avons choisi de comparer les effets de 2 doses : la dose de référence utilisée dans de nombreuses études (10 µg/jour) (Ikeda *et al.*, 2001; Patisaul *et al.*, 2009; Bertolasio *et al.*, 2011) et une dose 100 fois plus faible (sans impact sur le stock ovocytaire à 3 jpn, voir première publication). Leur impact sur la

première vague de croissance folliculaire (étape nécessaire à l'établissement du dialogue entre l'ovaire et ses centres de contrôle), la puberté et l'établissement de la cyclicité, les capacités de reproduction et la dynamique de recrutement folliculaire à l'âge adulte sont décrits. Par ailleurs les profils hormonaux (gonadotropines et hormones ovariennes) ont été établis.

Nous montrons que les ovaires des animaux traités mettent en place leurs premières vagues de croissance malgré les effets délétères constatés à la dose forte sur l'ovaire (voir première publication). La puberté survient plus tôt chez les animaux traités et leurs capacités de reproduction sont rapidement altérées (comme rapporté dans la littérature, McLachlan *et al.*, 1982; Newbold *et al.*, 1998; Varayoud *et al.*, 2011; Ohta *et al.*, 2012). Toutefois, si ces deux doses induisent le même effet (avancement de la puberté), les mécanismes mis en jeu sont très différents. Chez les animaux traités à forte dose, le recrutement folliculaire est inefficace, il ne conduit pas à la déplétion progressive de la réserve folliculaire, il n'y a pas d'ovulation et les ovaires sont atrophiés. Chez les femelles traitées à faible dose en revanche la réserve folliculaire est précocement épuisée et les ovaires sont souvent asymétriques et polykystiques.

Le troisième volet de ma thèse porte sur les effets immédiats dans l'ovaire d'un traitement aux deux doses d'œstradiol utilisées précédemment. Le premier jour de la vie étant crucial pour le développement ovarien et les conséquences à long terme (Cruz *et al.*, 2012), nous avons souhaité évaluer les conséquences directes de l'injection d'œstradiol le jour de la naissance qui pourraient être à l'origine de tous les troubles observés (voir parties 1 et 2). Les mécanismes conduisant à l'infertilité étant très différents à forte et faible dose, nous avons conservé ces deux doses pour comparer leurs effets sur le transcriptome ovarien, en particulier sur le cycle cellulaire, l'apoptose et la méiose, cibles connues de certains PEO (respectivement Peretz *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2002 et Zhang *et al.*, 2012b, Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2008, Lenie *et al.*, 2008). Les dommages de l'ADN induits par ces traitements ainsi que les capacités de réparation mises en place en retour ont également été évalués.

Nos résultats préliminaires démontrent que les traitements induisent des modifications transcriptomiques différentes. Par ailleurs les tests de génotoxicité indiquent que la proportion de cellules dont l'ADN est très endommagé à la suite du traitement est paradoxalement plus importante à la dose faible qu'à la dose forte mais les mécanismes de réparation sont plus efficaces à la dose faible.

Matériel et Méthodes



Figure 36 : Traitement d'une ratte nouveau-née par injection.

À la naissance, les rats pèsent environ 5 grammes et mesurent environ 5 cm. Ils reçoivent leur traitement à l'aide du matériel d'injection présenté sur la photo de droite: une aiguille de 27 G reliée à une seringue dont le piston est actionné par un micro-injecteur automatique.

Système Aramis

Codage des tatouages

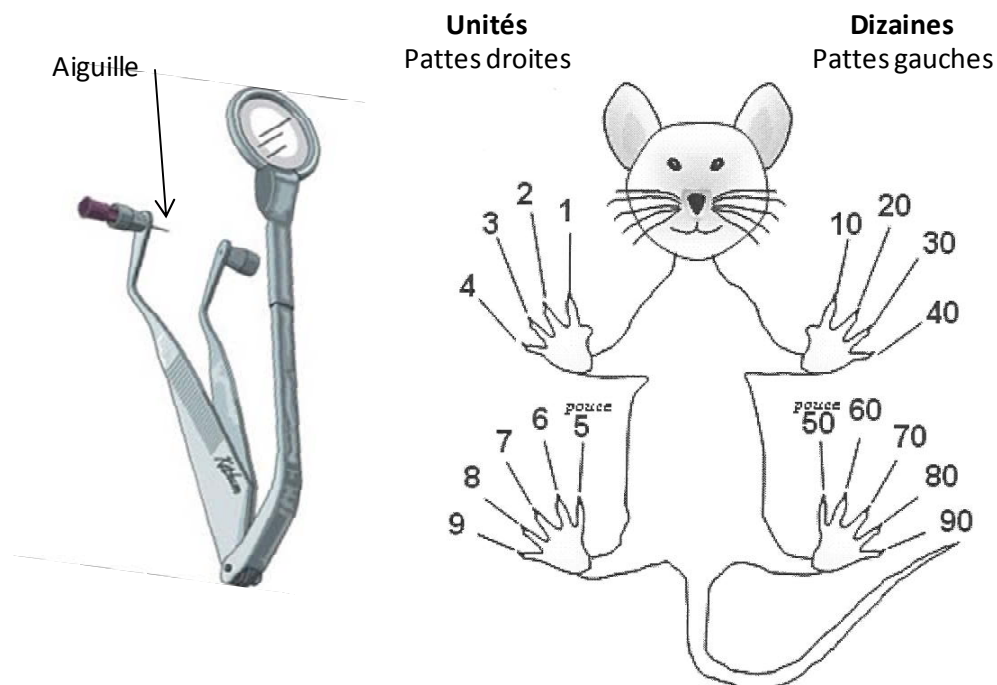


Figure 37 : Identification des animaux par tatouage. L'aiguille est enduite de colorant. En traversant la peau de l'animal, le colorant y reste de façon définitive. Un système de codage permet d'attribuer un numéro à chaque animal.

I. Les animaux

1. ORIGINE

Les animaux utilisés, des rats (*Rattus norvegicus*), sont de la souche Sprague-Dawley. Cette souche a été utilisée afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec des études antérieures de déplétion du stock ovocytaire par irradiation (Mazaud *et al.*, 2002 ;Guigon *et al.*, 2003a). Les animaux sont issus de l'élevage du laboratoire ou fournis par l'élevage Janvier (Le Genest St Isle, 53).

2. ENTRETIEN DE L'ÉLEVAGE

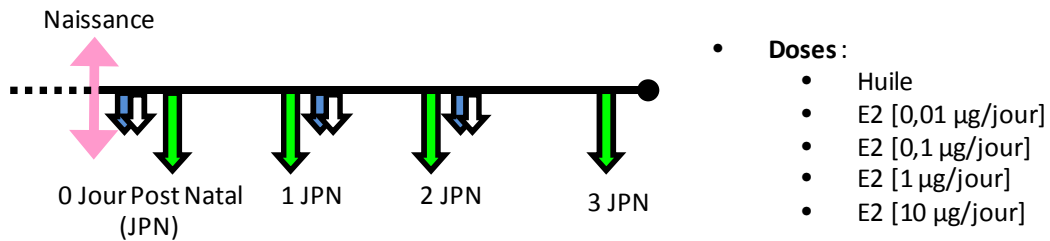
Les animaux sont soumis à un rythme nycthéméral de 12 heures jour/12 heures nuit. Leur alimentation, fournie par DIETEX France, contient du soja. Ils ont de l'eau à volonté. La température de l'animalerie est stable autour de $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ et l'hygrométrie relative est de $55 \pm 5\%$, selon la législation en vigueur concernant l'expérimentation animale. Les femelles sont cinq par cage. Elles sont régulièrement mises en contact avec un mâle pendant une nuit seulement afin de prévoir avec exactitude la date de la mise-bas en cas de gestation. Puis les rattes sont surveillées afin de repérer les éventuelles gestantes. Celles-ci sont séparées des autres la veille de la mise-bas et installées en cage individuelle enrichie en papier absorbant afin de fabriquer un « nid ». Après la mise-bas, survenant à 22.5 jours post-conception en début de matinée, les femelles nouveau-nées sont utilisées dans le cadre de l'étude et les mâles sont conservés afin d'homogénéiser le nombre de petits par portée au cours d'une même expérience. Une portée se compose généralement de 8 à 12 animaux.

3. TRAITEMENT POUR EXPÉRIMENTATION

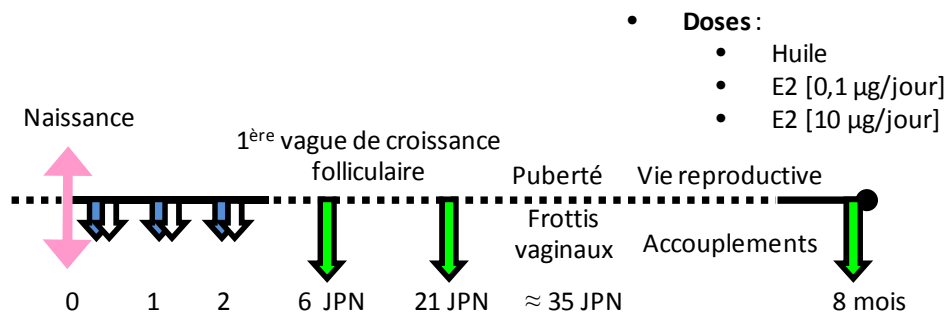
Les femelles sont différenciées des mâles grâce à leur distance ano-génitale réduite, pesées puis réparties par groupes selon la dose. En effet, les animaux nourris et soignés par une même mère reçoivent tous la même dose de traitement afin d'éviter les contaminations via la mère (en cas de léchage du point d'injection, le traitement peut alors passer dans le lait maternel puis contaminer les autres membres de la portée, ou un reflux au point d'injection peut entraîner une contamination des autres nouveau-nées par contact...).

Une solution mère de 17β -œstradiol (poudre, Sigma E 8875) est préparée, par dissolution dans de l'éthanol 100%. Les solutions filles sont préparées dans de l'huile de maïs (Sigma) à la concentration d'injection, soit $[1 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$; $[0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$; $[0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$ ou $[0.001 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$. À l'aide d'un micro-injecteur automatique, 10 μl de la solution finale sont délivrés à chaque animal à un débit de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ via un cathéter et une aiguille 0.4 mm 27G [microflex microperfuseur / infusion set VYGON #246.04]) (figure 36). L'injection, sous-cutanée (voie d'exposition classique dans l'étude des œstrogènes), est faite au niveau de la nuque des animaux dans un pli de la peau afin d'éviter le reflux de la solution (qui impliquerait que l'animal ne reçoit pas la totalité de la dose prévue, et ce de façon non contrôlable et non reproductible). Les animaux du groupe témoin reçoivent une injection d'huile de maïs additionnée d'éthanol 100 % dans les mêmes proportions que les animaux traités. Après traitement, les petits sont remis avec leur mère. La durée maximale de traitement est de 3 jours (0, 1 et 2 jpn) au rythme d'une injection quotidienne, la première étant administrée 2 ou 4 heures après la naissance. Des sacrifices par décapitation ont lieu régulièrement afin d'effectuer les prélèvements nécessaires.

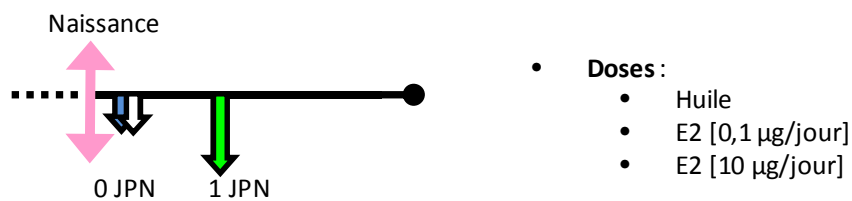
I) Dosages hormonaux / métabolisation / suivi du stock ovocytaire / caractérisation de l'apoptose



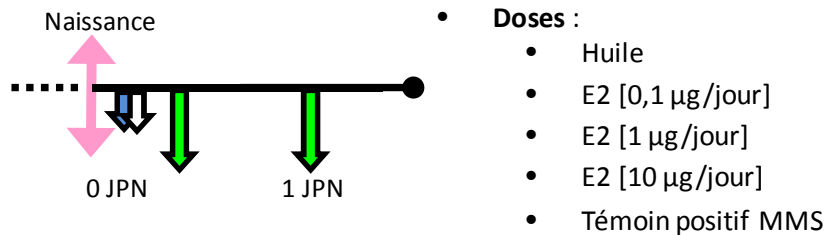
II) 1^{ère} vague de croissance folliculaire / puberté / capacités reproductives / dosages hormonaux



III a) Transcriptomique



III b) Génotoxicité



Effectifs	
Temps court	Temps long
4	5
4	5
4	5
4	5
4	0

Figure 38 : Stratégie expérimentale : traitements et prélèvements

- **Traitement** : injections sous-cutanées (10 µl)
 - Huile de maïs (H) témoin
 - 17β-œstradiol (E2)
 - Prélèvement

À la fin de la période de traitement, les femelles destinées aux tests à moyen (6 jours post-natal) ou long terme (puberté, évaluation des capacités de reproduction) restent avec leur mère jusqu'au sevrage effectif survenant à 21 jours puis sont séparées (cinq par cage, selon la législation en vigueur) comme décrit plus haut. Les animaux destinés à l'étude de la puberté et aux tests de fertilité sont tatoués, à l'âge de 8 jours, grâce au système Aramis (figure 37, page 130). Leurs phalanges sont marquées d'une encre verte selon un codage représenté sur la figure 37.

4. ACCORD DU COMITÉ D'ÉTHIQUE LOCAL

Tous les protocoles impliquant des animaux ont été visés par le Comité Rennais d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale et approuvés sous les numéros R-2012-CCh-01 et R-2012-CIch-01.

II. Les méthodes

1. PLAN EXPÉRIMENTAL

Le choix de la période de traitement (entre 0 et 3 jpn) a été dicté par la physiologie du développement ovarien. En effet, cette période est riche en modifications conditionnant la vie reproductive entière de l'animal. Le plan expérimental (présenté en figure 38) est articulé en trois parties utilisant des protocoles distincts.

La première partie a trait aux effets immédiats d'un traitement à l'œstradiol sur le métabolisme de cette hormone, l'évolution à court terme du stock ovocytaire et la caractérisation de l'apoptose. Il s'agit également de comparer les effets de 4 doses différentes.

La deuxième partie s'intéresse aux conséquences à moyen et long termes du traitement à 2 doses d'œstradiol (une dose dite « forte » et une dose dite « faible ») sur la première vague de croissance folliculaire, la survenue de la puberté et les capacités reproductives des animaux traités ainsi que leurs profils hormonaux.

La troisième partie évalue l'impact immédiat du traitement (à 2 ou 3 doses) sur le transcriptome ovarien et les dommages infligés à l'ADN, deux types d'atteintes potentiellement à l'origine des modifications des phénomènes observés de façon précoce dans l'organe mais aussi des troubles constatés chez l'animal adulte.

2. SUIVI PHYSIOLOGIQUE

À 28 jours commence la surveillance quotidienne des signes d'ouverture vaginale indiquant la puberté. Lorsque l'ouverture vaginale est constatée, les rattees sont pesées et soumises à un frottis journalier afin de détecter le premier œstrus et établir la durée de leurs cycles. Les frottis sont réalisés chaque matin à heure fixe pendant trois semaines à l'aide d'une anse bactériologique en plastique, déposés dans une goutte de sérum physiologique (NaCl 9‰) sur des lames de verre, séchés à l'air libre et colorés (5 min hématoxyline, rinçage à l'eau, 5 min éosine, rinçage à l'eau, 5 min alcool 96%).

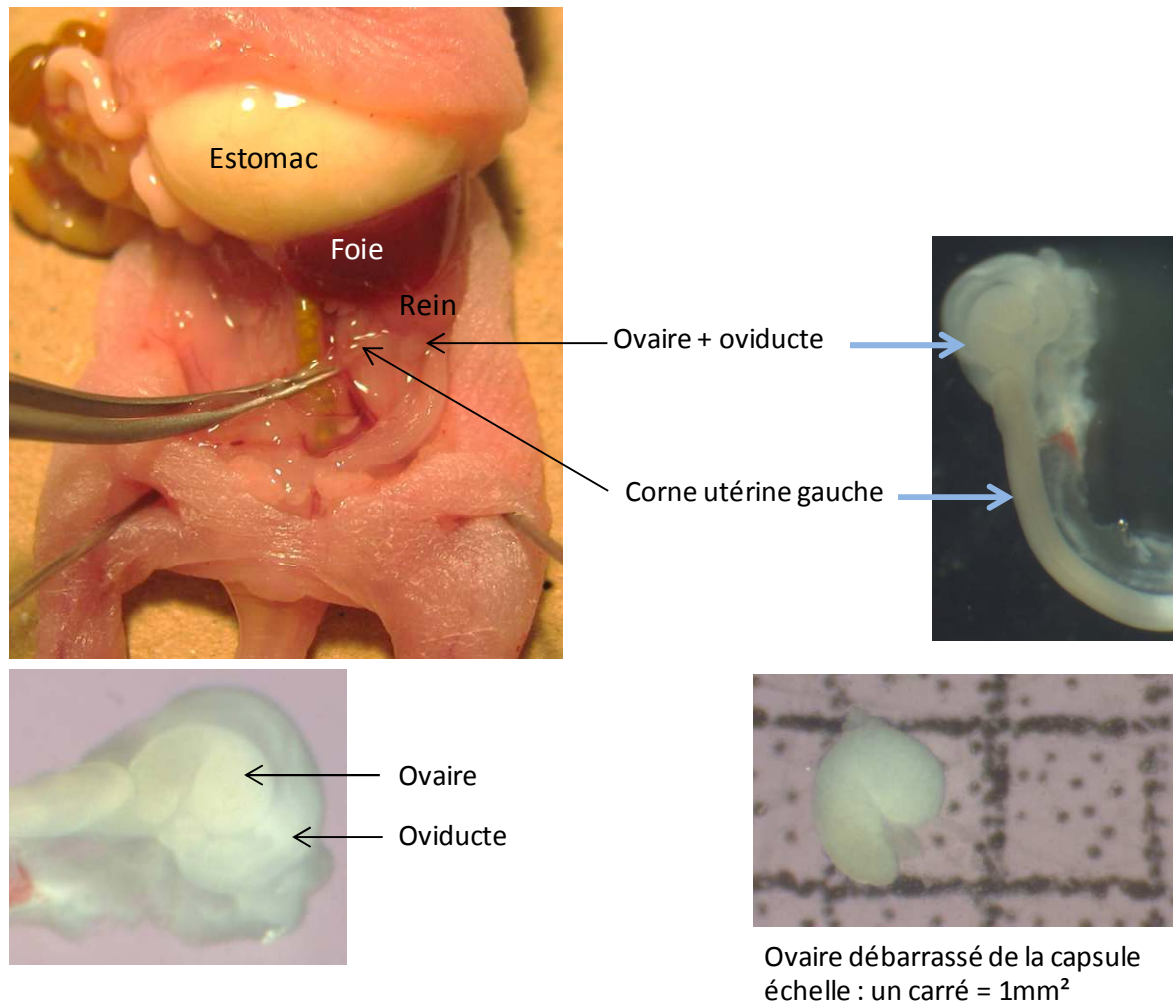


Figure 39 : Dissection de l'ovaire néonatal.

Pour évaluer les capacités de reproduction des femelles, elles sont mises en contact avec un mâle (non traité, issu de l'élevage du laboratoire) durant 5 jours et 5 nuits consécutifs afin de couvrir un cycle estrien complet, et ce à l'âge de 2, 3 et 4 mois. Les éventuelles gestantes sont isolées en cage individuelle en attendant la mise-bas. Le déroulement de celle-ci est surveillé, afin de s'assurer qu'elle se déroule bien. Dans le cas contraire, il existe un risque de rejet des petits de la part de la mère. Les soins apportés aux nouveau-nés sont également surveillés (la mère élimine les placentas, lave ses petits, les regroupe pour les maintenir au chaud et les allaite). Si une mère ne prodigue pas de soins à ses petits, il est possible de les faire adopter quelques heures après la naissance par une autre mère ayant des petits du même âge. Ceci permet en outre d'équilibrer le nombre de femelles par portée.

3. EUTHANASIE

Bien que figurant parmi la liste des méthodes d'euthanasie recommandées par les comités d'éthique en expérimentation animale, la méthode utilisée au cours de cette étude a été imposée par les besoins expérimentaux. Il fallait en effet une méthode extrêmement rapide pour bénéficier des derniers battements cardiaques post-mortem afin de récupérer le sang des animaux. Ceci excluait l'endormissement au CO₂, très long et de toute façon inadapté aux animaux en dessous de 10 jours, extrêmement résistants à l'hypoxie. Il fallait également une méthode n'entraînant pas de modifications des paramètres sanguins pouvant interférer dans les dosages hormonaux envisagés. Ceci excluait donc aussi l'euthanasie par injection d'une dose létale d'anesthésique. Les petits animaux (jusqu'à 6 jours) sont donc décapités à l'aide d'une paire de ciseaux. Les adultes sont également décapités, pour les mêmes raisons, à l'aide d'une guillotine.

4. DISSECTION

Après décapitation, le sang est récupéré soit via une pipette munie d'un cône à filtre hépariné (cas des animaux de moins de 6 jours) soit via un entonnoir (cas des pré-pubères et des adultes). Ce sang est centrifugé une heure à 3000 rpm (centrifugation douce, centrifugeuse Eppendorf 5417R). La phase supérieure, le plasma, est ensuite récupérée puis conservée à -20°C en vue des dosages hormonaux.

L'animal décapité est ensuite étendu sur le dos pour le prélèvement de ses organes (figure 39) :

- Chez la femelle de moins de 6 jours : ovaires, oviductes, foie, cerveau
- Chez la femelle de 21 jours et plus : ovaires, oviductes, utérus, reins, hypophyse

A. Animal de moins de 6 jours

La cavité abdominale est ouverte à l'aide de ciseaux fins en réalisant une boutonnière entre le nombril et la papille urinaire. La boutonnière est d'abord élargie latéralement et l'incision se poursuit le long des flancs de l'animal en remontant en direction de la cage thoracique. À cet âge, l'ovaire est lisse et en forme de haricot. Il est situé au bout des cornes utérines à proximité des reins dans une capsule en partie constituée par l'oviducte. Son prélèvement requiert des instruments adaptés à sa petite taille, on utilise donc des outils de microchirurgie optique. L'ovaire, encore

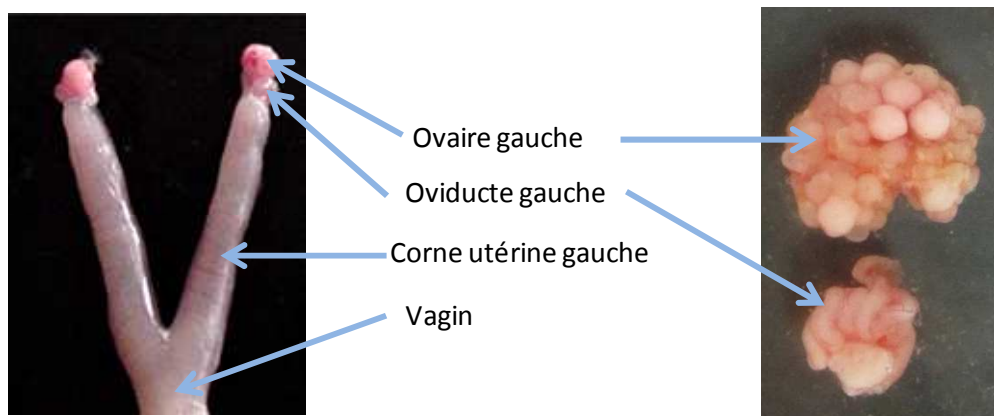


Figure 40 : Dissection du tractus génital femelle adulte

entouré de sa capsule, est déposé dans une boîte de Pétri contenant du PBS 1X pour être post-disséqué sous loupe binoculaire et débarrassé de sa capsule. Il est ensuite fixé (soit au paraformaldéhyde 4% en vue d'une inclusion en tissu teck pour hybridation *in situ*, soit dans du liquide de Bouin pour être ensuite inclus en paraffine pour étude histologique) soit congelé à sec et conservé à -80°C pour en extraire les ARN.

Un morceau de foie est prélevé sur le lobe principal puis congelé à sec et conservé à -80°C en vue de l'extraction des ARN.

Le cerveau est récupéré en ouvrant la boîte crânienne (encore fragile) latéralement à droite et à gauche puis sur la partie antérieure vers le museau. Elle peut alors être retirée pour découvrir le cerveau. Celui-ci est ensuite immergé dans du paraformaldéhyde 4 %.

B. Animal de 21 jours et plus

La cavité abdominale est ouverte en boutonnière à travers la peau et la couche musculieuse sous-jacente au dessus de la papille urinaire. Une incision médiane est réalisée à partir de cette boutonnière en direction de la cage thoracique de l'animal. Les volets de peau sont écartés et les intestins repoussés afin de dégager l'abdomen. En effet les ovaires, proches des reins, sont en position très dorsale.

L'ovaire prend petit à petit au cours de son développement un aspect de « framboise » : il est parsemé de petits renflements constitués par les follicules en cours de maturation. L'oviducte quant à lui s'est fortement enroulé sur lui-même pour former une sorte de petite pelote accolée à l'ovaire (et non plus autour de lui). Chaque oviducte est lié à une corne utérine, les deux cornes fusionnant dans leur partie distale pour ensuite se prolonger par le vagin (figure 40).

L'hypophyse est une petite glande située au centre du plancher de la boîte crânienne, en dessous des hémisphères cérébraux. Il faut donc ouvrir le crâne pour la déloger.

Les organes du tractus génital et l'hypophyse sont isolés puis pesés individuellement. Ensuite un morceau d'utérus est coupé pour fixation dans le liquide de Bouin, un ovaire ainsi que les oviductes sont également fixés avec du liquide de Bouin et le second ovaire ainsi que l'hypophyse sont congelés à sec et conservés à -80°C.

5. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

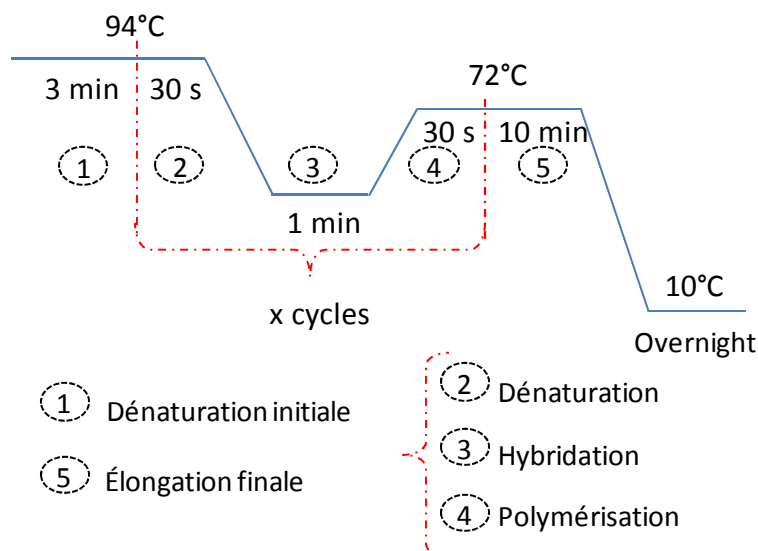
A. Extraction d'ARN et transcription inverse sur tissus congelés à sec

L'extraction des ARN totaux à partir d'organes congelés à sec a été réalisée à l'aide du kit Nucleospin XS kit (Macherey Nagel; 740902) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les organes sont d'abord broyés à l'aide d'une seringue dans du tampon de lyse contenant des agents chaotropiques, puis ce lysat est déposé sur une colonne filtrante afin d'éliminer les débris cellulaires. Le produit filtré est transféré sur une colonne d'adsorption en silice retenant les acides nucléiques. Les ADN sont éliminés par un traitement à la DNase et les ARN sont lavés par une succession d'ajouts de tampon de lavage et centrifugations. Enfin les ARN sont élués dans 30 µl d'eau préchauffée. Ils sont ensuite précipités par ajout de 3 µl d'acétate de sodium 3M (qui neutralise la solution), 0.2 µl de glycoblue

A

Gène	Séquences amorces (5'-3')	Position et n° accession	Taille amplicon
Dpp6	F : TCCATTACCTCTGGGGACTG R : GGCAGGTCTCTGTGCTTAG	1194-1285 de NM_ 022850	92
Ednrb	F : GCAGGATTCTGAAGCTCACC R : CAGCAGCACAAACACGACTT	996-1182 de NM_ 017333	187
H3f3b	F : TACCCTTCCAGAGGTTGGTG R : GGGCATGATGGTGACTCTCT	210-380 de NM_053985	170
Isyna1	F : ATTGGCTCTGGCCTCAAGAC R : ACACGGTTGCTCTGAACCAT	1060-1208 de NM_001013880	149
Ppp2r2b (1)	F : GCGTGATAAGAGGCCAGAAG R : ATGTGGTATGTGTGCGCATT	221-382 de NM_022209	162
Ppp2r2b (2)	F : CATTGCTTCTAGCGCTGAT R : AAAACCACTCTCCGAATCC	8-166 de NM_022209	159
Psmb9	F : GGCTGCTGCAAACATAGTGA R : CAAAGGGCTGTGCAATTAGC	291-433 de NM_012708	143
Rrm2	F : GCACTGGGAAGCTCTGAAAC R : GGCAATTTGGAAGCCATAGA	396-536 de NM_001025740	160
Sgk1	F : GCGCAATGTTCTGTTGAAGA R : TAGAACAGCTCTCCGCCATT	141-261 de NM_001193568	120

B



C

Réactif	Quantité
Trizma	121 g
Acide acétique glacial	28.55 ml
EDTA	50 ml

Figure 41 : Réaction de polymérisation en chaîne.

A: Couples d'amorces ayant été utilisés en PCR (ou qPCR) au cours de cette étude. La taille des amplicons est exprimée en bases. Ne figurent ici que les amorces non publiées dans le premier article.

B: Cycles de températures permettant l'amplification. La température d'hybridation varie selon les amorces utilisées.

C : Composition du TAE 50X (pH8) nécessaire à la préparation du tampon d'électrophorèse (dilution au 50^{ème}).

[20 mg/ml] (tampon de charge) et 80 µl d'éthanol pur et laissés à -20°C une nuit. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 30 minutes à 14 000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804R). Le surnageant est retiré, le culot est rincé à l'éthanol 70 % et à nouveau centrifugé (4°C, 15 min, 14 000 rpm). Le culot est ensuite séché à l'air et repris dans 15 µl d'eau. Les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop) par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260}) : 1 unité de Densité Optique = 40 µg d'ARN /ml. Le rapport A_{260} / A_{280} doit être environ égal à 2 pour considérer que les échantillons sont « purs ». 250 µg d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc selon la technique du « random priming » décrite par Taylor *et al.*, 1976. Des hexanucléotides s'hybrident sur l'ARN matrice au hasard de leur complémentarité et permettent l'action de la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV, reverse transcriptase superscript II, Invitrogen). Les ARN sont tout d'abord dénaturés 5 minutes à 65°C en présence de 800 ng de « random primers » dans un volume final de 11 µl complété avec de l'eau. Puis des nucléotides (10 mM chacun) et 1 unité de M-MLV sont ajoutés, en présence de RNase out et DTT (dithiothreitol) (qui inhibent les enzymes dégradant les ARN) et d'un tampon (« first strand buffer 5X ») dont le rôle est de maintenir des conditions de réaction favorables à l'action de la M-MLV (1h30 à 37°C). Le produit est repris dans 40 µl finaux, aliquoté par 10 ou 20 µl et conservé à -20°C.

B. PCR conventionnelle et PCR quantitative

i. PCR conventionnelle (et électrophorèse)

Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne *in vitro* (Polymerase Chain Reaction, PCR) repose sur les effets sur l'ADN des variations de température et la capacité de l'ADN à s'apparier spontanément grâce à la complémentarité des bases qui le composent. Il a été mis au point par Mullis *et al.*, (Mullis *et al.*, 1986). Cependant la chaleur nécessaire à la dénaturation de l'ADN double brin dénaturait également la polymérase bactérienne utilisée pour synthétiser les nouveaux brins. Ce problème fut résolu en 1988 quand l'enzyme bactérienne fut remplacée par une polymérase extraite d'un micro-organisme hyperthermophile : *Thermophilus Aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). Celui-ci donne son nom à l'enzyme encore utilisée aujourd'hui, la Taq polymérase. Des amorces -courtes séquences nucléotidiques- sont fabriquées de façon à ce que leurs séquences soit complémentaires des extrémités du fragment d'ADN que l'on souhaite étudier. La présence d'une amorce sur chaque brin (amorce « sens » et « antisens » ou « forward F » et « reverse R » en anglais) permet de délimiter de façon spécifique la zone d'intérêt. Ces amorces, présentées dans la figure 41 A, s'apparient donc aux extrémités du fragment d'intérêt et la Taq polymérase vient ensuite les prolonger par la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

L'ADN double brin est dénaturé pour permettre la fixation des amorces, les nouveaux brins sont synthétisés grâce à la complémentarité des bases puis l'ADN subit une nouvelle étape de dénaturation qui sépare les brins, les rendant aptes à recevoir une nouvelle fois des amorces. Ces cycles sont répétables un grand nombre de fois, mais plus il y a de cycles, plus les conditions de réaction deviennent défavorables et moins la synthèse est efficace. Le milieu de réaction est composé d'amorces (un mélange d'amorces F et R à 20 µM chacun), d'ADN matrice (1 µl de produit

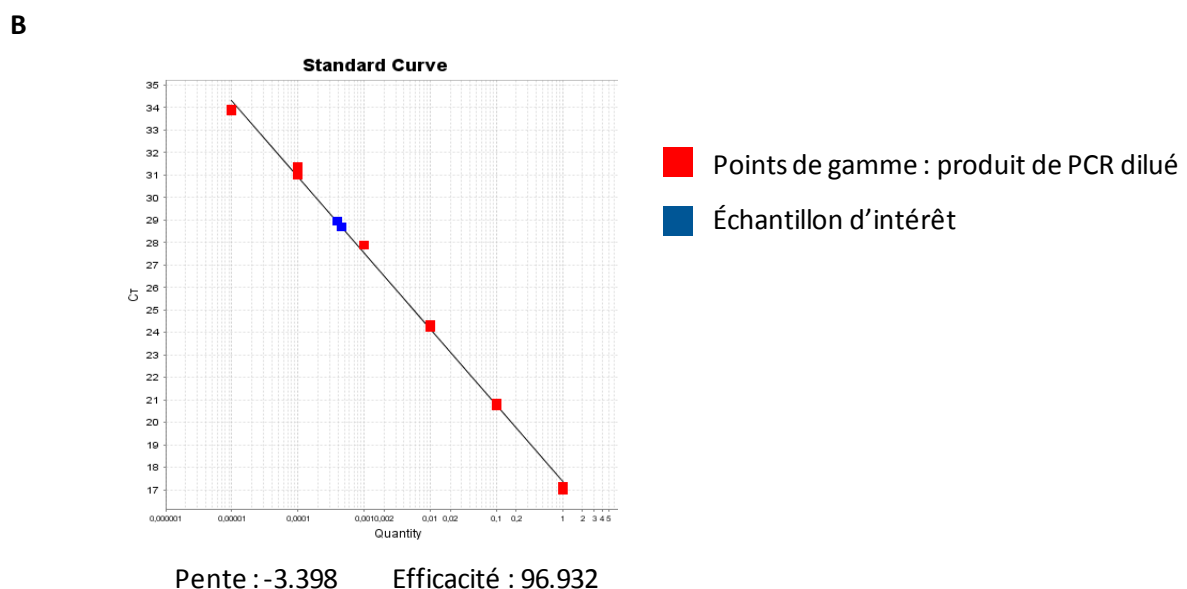
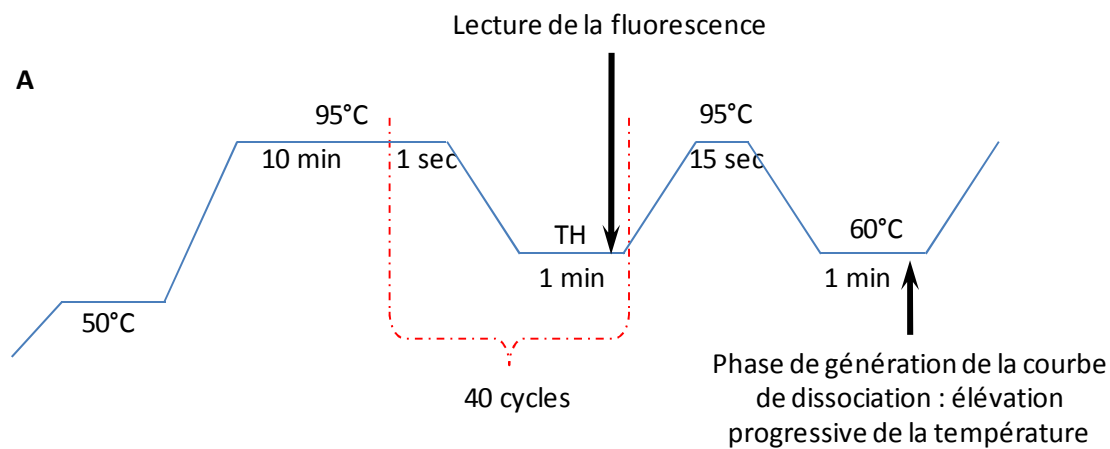


Figure 42 : PCR quantitative (qPCR)

Elle repose sur les mêmes principes que la PCR conventionnelle mais l'incorporation d'une molécule fluorescente permet de suivre en temps réel la formation de nouveaux brins d'ADN.

A : Représentation du cycle de qPCR. La température d'hybridation (TH) varie selon les amorces utilisées. Elle est la même qu'en PCR conventionnelle.

B : Gamme. La droite représente le CT en fonction de la concentration d'ADNc du gène d'intérêt (échelle logarithmique). Cette droite doit être linéaire sur 5 log et le CT des échantillons d'intérêt doit appartenir à la partie linéaire de la droite. L'efficacité de la qPCR doit être aux alentours de 100 % et équivalente entre le gène d'intérêt et le gène de référence.

de la rétrotranscription de 250 ng dans 40 µl soit environ 6 ng), de désoxynucléotides libres pour former les nouveaux brins (0.6 µl d'un mélange à 10 mM), de Taq polymérase (0.6 U - Qiagen), d'un tampon de réaction (10 X PCR buffer Coral Load - Qiagen) assurant notamment la stabilité du pH du milieu et d'eau (qsp 25 µl). Le mélange réactionnel est ensuite placé dans un thermocycleur qui assure les variations de température (figure 41 B) : l'étape de dénaturation à 94°C sert à dissocier les molécules d'ADN double brin en rompant les liaisons hydrogène qui les maintiennent. C'est aussi le rôle de l'étape 2. La température s'abaisse ensuite pour atteindre la température d'hybridation des amorces sur la matrice (étape 3). Cette température est variable selon les amorces utilisées, elle dépend de leur composition en bases et est calculable selon la formule « $[2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)] - 2$ ». Les 2 amorces d'un même couple doivent avoir une température d'hybridation similaire. L'étape 4 est dite de « polymérisation ». Elle a lieu à 72°C, la température optimale d'activité de la Taq polymérase. Chaque répétition des étapes 2-3-4 permet un doublement du nombre de copies du fragment d'ADN d'intérêt dans le milieu de réaction. En fin d'amplification, une 5^{ème} étape d'élongation finale termine la réaction et l'ADN est refroidi pour permettre sa conservation (quelques heures à 10 °C, puis à -20°C).

La migration sur gel d'agarose est utilisée pour contrôler la qualité de la PCR. Un gel à 1.2 % est réalisé (dissolution à chaud de 0.6 g agarose dans 50 ml TAE 1X (figure 41 C) et 5 µl de Gel Red, un intercalant de l'ADN qui se fixe dessus et possède des propriétés de fluorescence sous ultra-violet permettant sa révélation). Le gel, une fois refroidi et solidifié, est immergé dans une cuve polarisée contenant du tampon TAE 1X. 10 µl de produit de PCR ou un marqueur de taille sont déposés dans des puits formés par un peigne placé dans le gel en surfusion et dont les dents laissent leur empreinte dans le gel solidifié. Un courant électrique circulant du pôle – vers le + fait migrer les fragments d'ADN sur le gel selon leur taille : les grands fragments, plus encombrants, sont ralentis par les mailles constituées par le gel alors que les petits migrent plus vite. À la fin de la migration, le gel est placé sous ultra-violet. Les bandes qui apparaissent sont les fragments d'ADN amplifiés. Une seule bande indique la présence d'un seul produit d'amplification et la comparaison avec un marqueur de taille (mélange standardisé contenant des fragments d'ADN de différentes tailles connues) permet d'estimer la taille de ce produit.

ii. qPCR

La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel (figure 42 A) suit le même principe que la PCR classique décrite plus haut : l'ADNc est dénaturé, les amorces s'hybrident de façon spécifique (à une température définie en PCR conventionnelle), un nouveau brin complémentaire est synthétisé. Mais la qPCR intègre la détection et la quantification d'une molécule dont la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés à chaque cycle du processus d'amplification. En 1993, Higuchi décrit cette technique en utilisant comme molécule fluorescente le Bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN (Higuchi *et al.*, 1993). Ici le BET est remplacé par un fluorochrome de nouvelle génération, le Bryt Green (Promega), et la qPCR est réalisée sur un appareil Applied Biosystems 7500 Real-Time. La qPCR implique la notion de seuil défini comme étant

la valeur de fluorescence significativement supérieure à celle du bruit de fond, toujours obtenue lors de la phase exponentielle de l'amplification. Un cycle-seuil (ou Cycle Threshold, Ct) est alors déterminé et correspond au cycle de PCR au cours duquel la fluorescence émise dépasse le seuil. La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de copies du gène d'intérêt présentes dans le milieu réactionnel. Les courbes de dissociation (ou « de fusion ») sont obtenues à la fin des 40 cycles par élévation progressive par palier de 0.5°C de la température entre la température d'hybridation et 95°C avec mesure de la fluorescence en continu : plus la température s'élève, plus les amplicons se dissocient en fonction de leur taille et composition en bases. Si la taille ou la composition varie, le pic de dissociation survient à une température différente, démontrant la détection de plusieurs amplicons. Ceci permet aussi de détecter tout ADN, y compris les dimères d'amorces (petit pic à moindre T°C qui apparaît aussi dans les témoins négatifs sans matrice) ou une aspécificité d'amorces. Afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique résiduel, les deux membres du couple d'amorces sont situés sur des exons différents. La taille de l'amplicon est également un facteur important. Elle se situe généralement entre 70 et 200 paires de bases. Les petites tailles sont privilégiées car la synthèse s'en trouve facilitée.

Une gamme-étalon (figure 42 B) est nécessaire pour évaluer l'efficacité de la réaction et le coefficient de corrélation entre le CT et la quantité d'ADN détectée. Elle est réalisée sur des produits de PCR (préalablement dilués au 1/10000^{ème}) dilués au 10^{ème} en cascade. Le produit de PCR est généré par 38 cycles d'amplification en utilisant comme matrice l'ADNc d'un échantillon d'intérêt. L'efficacité est liée à la pente de la droite représentant le CT du gène d'intérêt en fonction de la quantité d'ADNc d'intérêt présent dans la matrice. En réalisant cette gamme, on ajoute un point pour lequel, au lieu de produit de PCR dilué, la matrice utilisée est un ADNc d'un échantillon d'intérêt afin de s'assurer que sa concentration est comprise dans la gamme.

Cette technique permet deux types de quantification : la quantification absolue (détermination en nombre de copies du gène) ou la quantification relative, méthode utilisée lors de cette étude. Elle consiste à rapporter les variations de l'expression des gènes d'intérêt détectée lors des cycles de qPCR à l'expression d'un gène de référence (stable) et d'un échantillon calibrateur. A efficacité de PCR équivalente, le rapport d'expression entre deux conditions est calculé selon la méthode du 2^{-ΔΔCT} qui repose sur la formule suivante (où « éch » = « échantillon ») décrite par Livak & Schmittgen, 2001:

$$\Delta\Delta CT = [(Ct_{\text{gène d'intérêt éch. 1}} - Ct_{\text{gène de référence éch. 1}}) - (CT_{\text{gène d'intérêt éch. calibrateur}} - CT_{\text{gène de référence éch. calibrateur}})]$$

Le choix du gène de référence, en l'occurrence Snx17, a été basé sur la connaissance de son expression dans la gonade à un niveau relativement faible permettant la comparaison avec les niveaux d'expression de nos gènes d'intérêt ainsi que pour sa stabilité d'expression (il ne doit pas être impacté par les conditions expérimentales). L'échantillon calibrateur est quant à lui constitué d'un mélange en quantités égales des ADNc de tous les échantillons à tester.

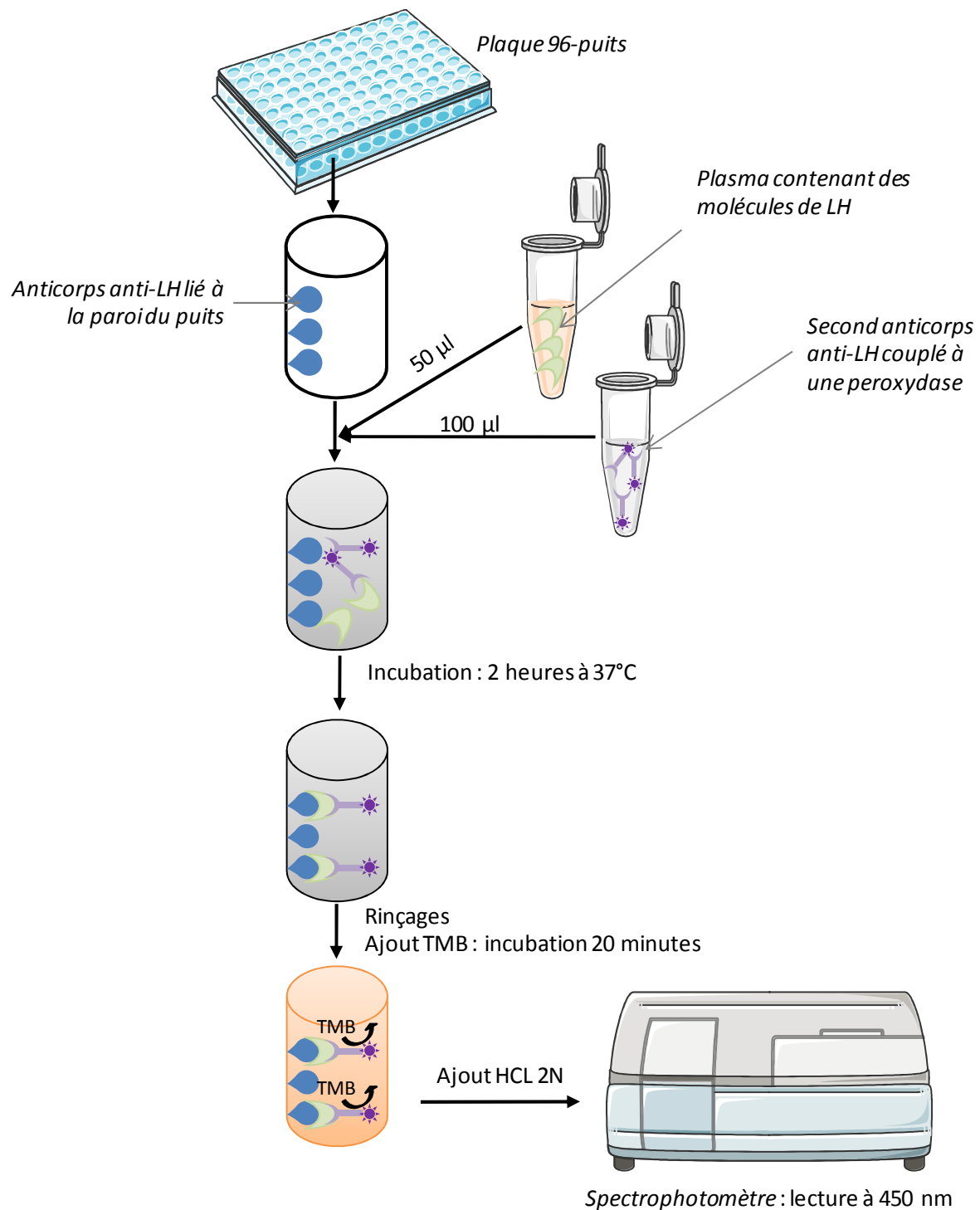


Figure 43 : Dosage LH par ELISA

La technique est exactement la même avec FSH (dépôt de 100 μ l de plasma au lieu de 50 et incubation de 3 heures au lieu de 2).

C. Dosages hormonaux

i. *Dosages des gonadotropines : ELISA*

Le test ELISA (ou « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay », immunoabsorption enzymatique, présenté en figure 43) repose, tout comme l'immunohistochimie sur tissus, sur le principe de détection antigénique couplée à une enzyme qui, au contact de son substrat, génère un produit coloré. Cependant, au lieu de marquer les protéines détectées au sein du tissu, l'ELISA se déroule en milieu aqueux. Ce test est quantitatif puisqu'il induit la production d'une coloration proportionnelle à la quantité de protéines détectée. Ceci permet la mesure de la densité optique de la solution et l'extrapolation de la quantité mesurée par report sur une gamme étalon composée de points de mesure d'absorbance de solutions contenant une concentration protéique connue.

Le dosage de la FSH et de la LH circulantes chez les animaux traités et témoins à 21 jours ou à l'âge adulte a été réalisé selon cette méthode à l'aide de kits Abnova (KA-2330 et KA-2332). Le test se déroule en plaque 96 puits. L'intérieur des puits est tapissé d'un premier anticorps anti-LH (ou anti FSH). 50 µl de plasma (pour le dosage de la LH) ou 100 µl (pour le dosage de la FSH) sont ajoutés dans les puits avec 100 µl d'un second anticorps anti-LH (ou FSH) couplé à une peroxydase. Après une incubation à 37°C pendant 2 heures (dosage LH) ou 3 heures (dosage FSH), des rinçages avec un tampon de lavage dilué au 20^{ème} dans de l'eau distillée permettent d'éliminer toutes les molécules non liées, soit tout ce qui n'appartient pas au complexe d'intérêt « 1^{er} anticorps anti-LH / LH / 2^{ème} anticorps anti-LH / peroxydase ». L'ajout d'un substrat de la peroxydase, le tétraméthylbenzidine (TMB), suivi d'une incubation de 20 minutes à l'obscurité permet la formation d'un précipité jaune. Afin de neutraliser cette réaction, 50 µl de HCL 2N sont ajoutés. La quantité de composé jaune formée, et donc l'intensité de la coloration, est directement proportionnelle à la quantité de complexe d'intérêt assemblés, reflétant la quantité de LH (ou FSH) présente dans le plasma. Pour estimer cette quantité, l'absorbance est mesurée dans chaque puits par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Pour savoir à quelle quantité de LH (ou FSH) correspond une unité d'absorbance, certains puits sur la plaque contiennent, à la place du plasma, une quantité connue de LH (ou FSH) afin de réaliser une gamme-étalon dont l'équation de droite permet l'extrapolation de la quantité de LH (ou FSH) dans chacun des échantillons testés.

ii. *Dosage des stéroïdes : GC/MS-MS*

Les dosages de stéroïdes (E1, E2, E3, E1-S et E2-S) ont été réalisés par Frank Giton, ingénieur de recherche au sein de l'équipe 7 de l'U955 – IMRB – Créteil grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

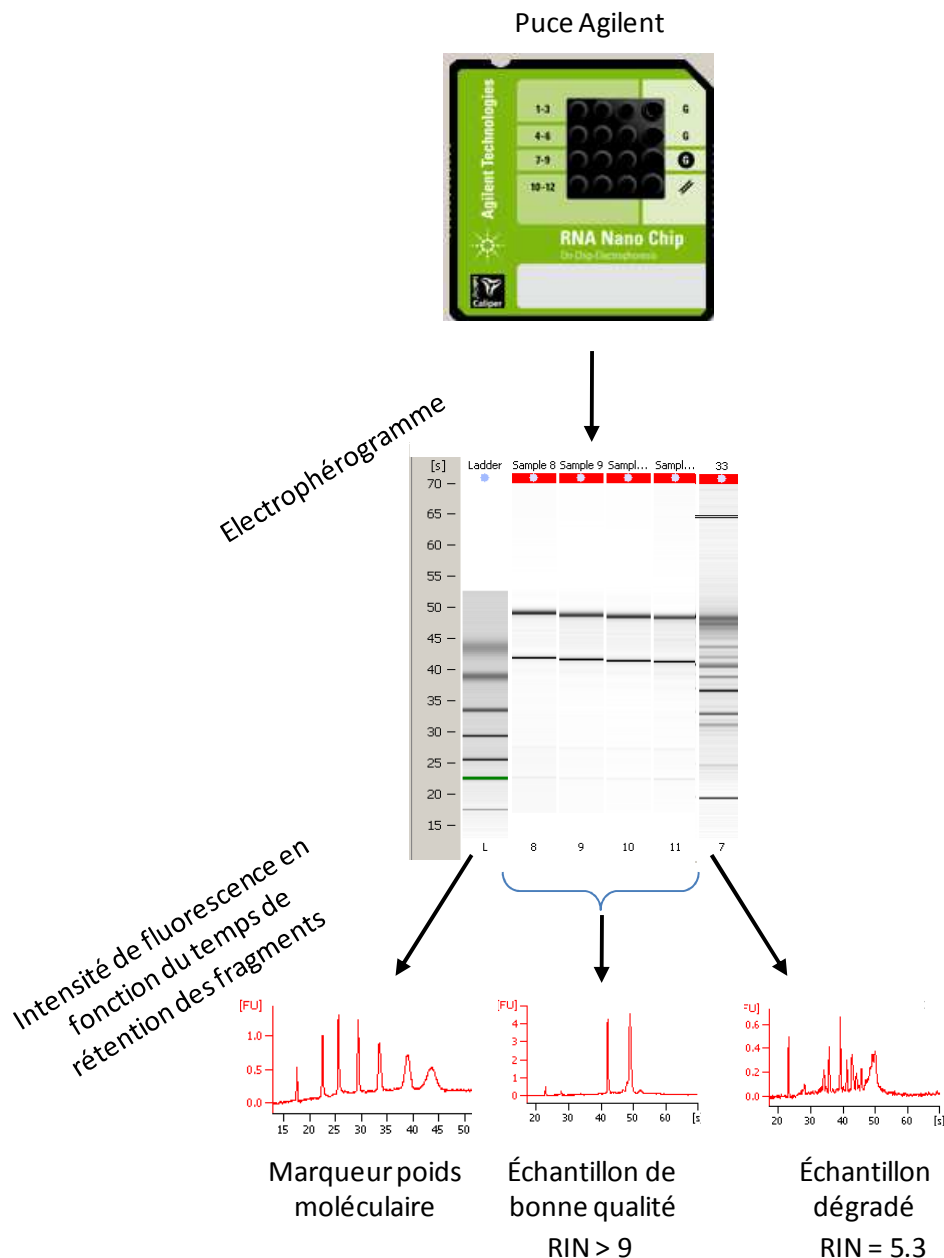


Figure 44 : Contrôle de la qualité des ARN – Bioanalyseur

La puce Agilent est composée de 16 puits communiquant entre eux par un microréseau. Le bioanalyseur « lit » la puce et fournit un électrophérogamme, un profil d'intensité de fluorescence en fonction du temps de rétention dans le microréseau et un RIN par échantillon. Des ARN de bonne qualité ne présentent que 2 bandes très visibles sur l'électrophérogamme alors qu'un échantillon dégradé présente une multitude de bandes. Les 2 pics visibles dans les échantillons de bonne qualité sont constitués par les ARN 18 et 28S des sous-unités ribosomiques.

D. Puces / microarrays

Une puce, ou microarray, est un outil permettant de mesurer simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes. La puce est composée d'une multitude de molécules d'ADN -les sondes- fixées sur un support solide de petite taille (moins de 2 cm²). Ces sondes sont de courtes séquences (environ 20 nucléotides) spécifiques de leur gène cible. La technique est basée sur le principe de ré-appariement spontané de séquences nucléotidiques complémentaires par création de liaisons hydrogène. Les puces utilisées au cours de cette étude sont des GeneChip Rat Gene 1.0 ST array (#901173 – Affymetrix). Elles peuvent interroger dans un échantillon la présence de 24 000 gènes (sur environ 26 000 gènes totaux chez le rat) avec en moyenne 22 sondes par gènes, permettant une étude prospective du transcriptome selon les conditions de traitement des échantillons. En effet, pour refléter l'expression des gènes à un moment défini, les ADNc issus de la rétrotranscription des ARN seront hybridés sur les sondes portées par la puce. Nous avons utilisés comme échantillons des « pools » d'ovaires extraits d'animaux âgés de 1 jour et traités 4 heures après leur naissance soit avec de l'huile de maïs, soit avec de l'E2 [10 µg], soit E2 [0.1 µg] et disséqués à 24 heures. Chaque pool contient entre 8 et 12 ovaires issus de 5 à 12 animaux. Deux puces ont été réalisées pour chaque dose, utilisant les ARN de deux pools différents. Les ovaires récupérés sur les animaux à 1 jpn sont congelés par pools à -80°C en attendant d'être utilisés. Les ARN totaux sont extraits selon le protocole décrit précédemment.

i. Contrôle qualité des ARN

Seuls des ARN purs et intègres peuvent être utilisés. Ces deux paramètres sont donc vérifiés au moyen de « puces Agilent » (RNA 600 Nano) sur un bioanalyseur (Agilent 2100). La puce Agilent (figure 44) est un outil miniaturisé composé de 16 puits, dont 12 destinés aux échantillons et 1 au marqueur de poids moléculaire. Les puits sont interconnectés par des microréseaux. On dépose d'abord dans l'un des puits un gel d'électrophorèse filtré qui grâce aux microréseaux se répartit sur toute la puce (« électrophorèse capillaire »). Ce gel est enrichi en agent intercalant capable de marquer les molécules d'ARN. Un tampon est ensuite ajouté dans chaque puits afin de garantir aux ARN un milieu favorable (notamment en termes de pH, afin de ne pas les endommager). Un marqueur de poids moléculaire est ajouté dans le puits dédié. Les échantillons sont déposés dans les 12 puits prévus à cet effet. Cette technique permet une analyse fine de la qualité et de la concentration d'ARN sur une très petite quantité d'échantillon (environ 300 ng). Une fois prête, la puce est vortexée puis installée dans le bioanalyseur. L'analyse totale dure environ 30 minutes au cours desquelles les puits sont analysés un par un en commençant par celui contenant le marqueur de poids moléculaire. Une électrode entre en contact avec chaque puits et l'application d'un champ électrique (comme lors d'une électrophorèse classique) permet la séparation des brins d'ARN selon leur taille et leur migration plus ou moins rapide à travers le microréseau. En circulant dans le gel, les ARN se lient avec l'intercalant. À la fin du circuit, les molécules sont détectées par fluorescence grâce à l'intercalant. L'appareil mesure l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention

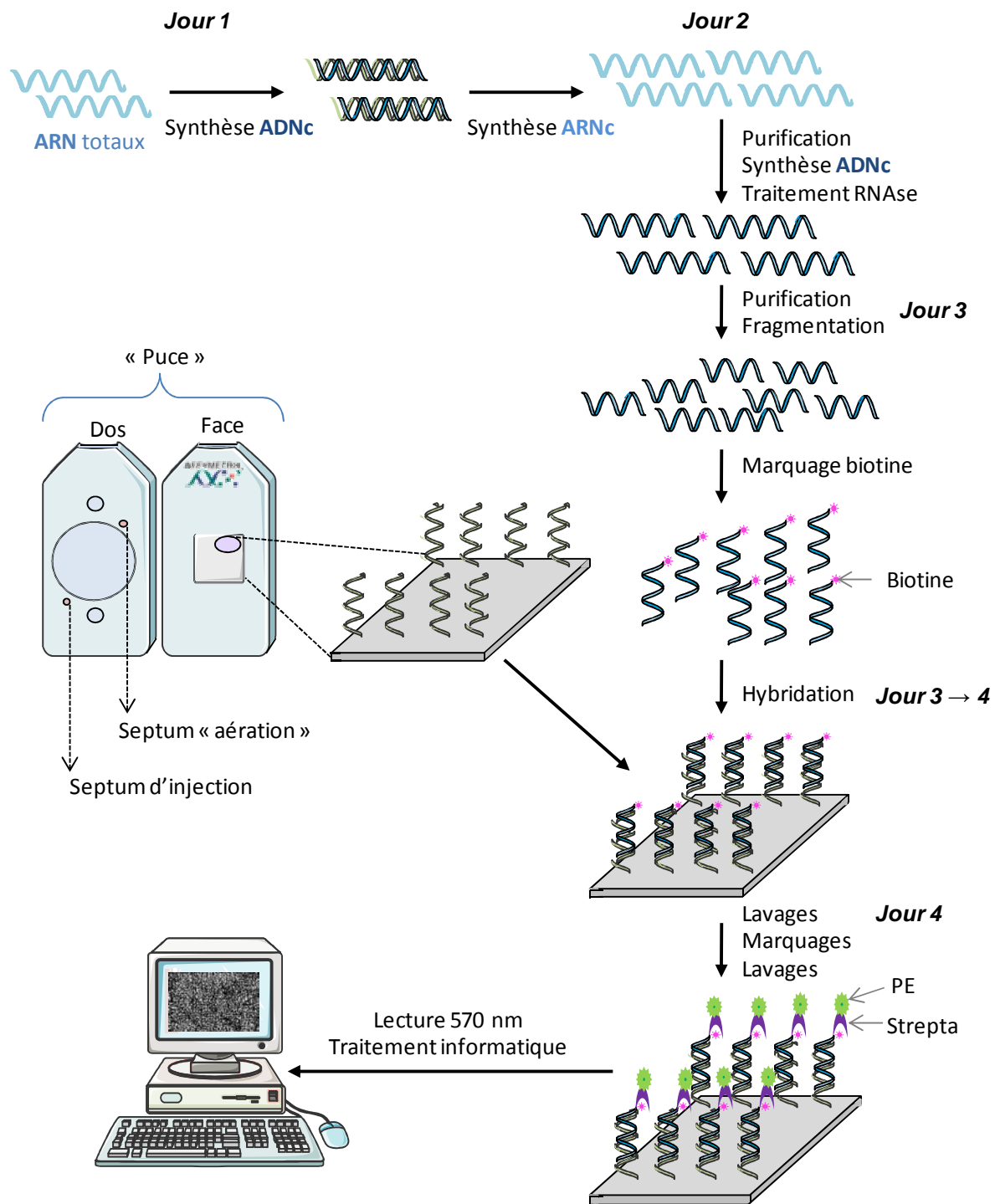


Figure 45 : Puces à ADN - Microarray

Les ARN sont soumis à 2 cycles de rétrotranscription / transcriptions *in vitro*. Puis les ADNs obtenus sont fragmentés, marqués à la biotine et hybridés sur la puce composée de sondes greffées sur un support inclus dans une « chambre » munie de 2 ouvertures, les septa d'injection et d'aération. Une fois l'hybridation réalisée, les puces sont lavées et marquées à l'aide de streptavidine (Strepta) ayant une forte affinité pour la biotine. Cette streptavidine est couplée à la phycoérythrine (PE) aux propriétés fluorescentes permettant la lecture à une longueur d'ondes de 570 nm et générant une cartographie d'intensité de fluorescence.

de l'échantillon dans le microréseau (les fragments longs sont retenus plus longtemps que les courts et plus il y a d'ARN, plus la fluorescence émise est importante). Le temps de rétention et l'intensité de fluorescence sont comparés aux valeurs générées par le marqueur de poids moléculaire. Le bioanalyseur attribue un « RNA Integrity Number » (RIN) à chaque échantillon, ce RIN tient compte de l'intégralité de l'électrophérogramme ainsi que du rapport 28S/18S et reflète la qualité d'un ARN (Schroeder *et al.*, 2006). Sa valeur est comprise entre 1 et 10, 10 étant la qualité maximale. Seuls des ARN dont le RIN est supérieur à 8.5 sont retenus pour réaliser les puces « Affymetrix ».

ii. Puces « Affymetrix »

Jour 1 - Amplification, transcription inverse et transcription *in vitro*

La préparation et la lecture de ces puces se déroulent sur 4 jours strictement selon les instructions du fournisseur et sont présentées en figure 45. Le premier jour, suivant les instructions du kit *Ambion WT expression kit (4411973 10 rxn)*, 250 ng d'ARN sont prélevés et mélangés avec de l'ARN poly-A destiné à améliorer l'efficacité des réactions successives mises en œuvre avant d'hybrider les échantillons sur les puces « Affymetrix ». Un ARN contrôle (*Affymetrix GeneChip Poly-A control kit #900433*) est soumis aux mêmes réactions successives d'amplification et de purification. Il sert de contrôle interne à l'expérience. Les tubes « ARN totaux » et « ARN contrôle » sont traités de la même façon. Ils sont d'abord utilisés pour synthétiser le premier brin d'ADNc dans un thermocycleur pendant 2 heures. Puis le second brin est synthétisé (2 heures). Ces 2 brins sont ensuite rétrotranscrits *in vitro* en ARNc à 40°C pendant 16 heures.

Jour 2 - Purification, transcription inverse

Le deuxième jour cet ARNc subit une première étape de purification sur billes magnétiques : ces billes captent les acides nucléiques et les immobilisent. Un aimant est ensuite utilisé pour les maintenir contre la paroi du tube où se déroule la réaction, le milieu est retiré à l'aide d'une pipette, remplacé deux fois par une solution de rinçage puis par une solution d'éluion dans laquelle se libèrent les ARNc. Les billes sont alors retirées à l'aide de l'aimant. 10 µg de ces ARNc sont soumis à un second cycle de synthèse d'ADNc (environ 2 heures) puis les échantillons sont traités à l'aide d'une RNase afin d'éliminer les matrices et congelés durant une nuit à -20°C.

Jour 3 - Purification, fragmentation, marquage biotine, hybridation

Le troisième jour, les ADNc sont purifiés sur billes magnétiques (voir « jour 2 »). À l'aide du kit *Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling Kit (PN 900671)*, 5.5 µg d'ADNc sont ensuite soumis pendant une heure à l'action d'une enzyme chargée de les fragmenter pour former des séquences courtes destinées à être hybridées sur les puces. Ces séquences sont ensuite couplées à de la biotine (1 heure). Un mélange d'hybridation est préparé à partir des ADNc marqués, d'ARN eucaryote servant de contrôle interne à l'expérience et de tampons et 80 µl sont déposés sur la puce (*Affymetrix 901173*). Le mélange est injecté sur la puce à travers un septum d'injection dans une chambre dont l'une des parois est couverte par les sondes. Le perçage préalable du septum

d'aération permet d'évacuer l'air de la chambre à mesure qu'elle se remplit avec le mélange d'hybridation. Toutefois, une bulle d'air est maintenue dans la chambre. Elle sert à homogénéiser la solution d'hybridation et à assurer que cette solution circule sur toute la surface de la puce couverte par les sondes. L'hybridation se déroule pendant 17 heures sous agitation à 45°C.

Jour 4 - Rincages, marquage fluorescent, lecture

Le quatrième jour, les puces sont rincées, marquées à l'aide d'un complexe streptavidine (forte affinité pour la biotine) – phycoérythrine (permettant l'émission de fluorescence) et à nouveau rincées dans les stations dédiées Affymetrix (GeneChip Fluidics Station 450) à l'aide du kit *Affymetrix 900720*. La fluorescence est mesurée à 570 nm par un scanner qui génère une cartographie d'intensité en nuances de gris. Un traitement informatique permet ensuite de faire le lien entre cette cartographie d'intensité et la liste des sondes présentes sur la puce et interrogées au sein de chaque échantillon, quantifiant ainsi les niveaux d'expression pour chaque gène.

Analyse bioinformatique - AMEN

L'analyse des données brutes générées par la lecture des puces requiert la maîtrise d'outils bioinformatiques. Elle a donc été réalisée en collaboration avec Frédéric Chalmel, chargé de recherche au sein de l'équipe. Il a en effet développé un logiciel de traitement de données nommé « Annotation, Mapping, Expression and Network » (AMEN) (Chalmel & Primig, 2008). Ce logiciel permet de traiter et normaliser les données brutes générées (fichiers .cel) à la lecture des puces par le scanner Affymetrix, puis de réaliser les différentes filtrations statistiques qui conduisent à l'identification des gènes dont l'expression est significativement modifiée entre les échantillons de référence et les autres et de grouper les gènes selon leurs profils d'expression. Le logiciel intègre également les annotations des gènes disponibles dans les banques de données publiques telles que Gene Ontology (GO, processus biologiques) ou encore Comparative Toxicogenomics Database (CTD, impact des produits chimiques). Ceci permet de réaliser des analyses fonctionnelles permettant de dégager des tendances significatives, à savoir des enrichissements sur la base de ces annotations, au sein des lots de gènes obtenus. Concrètement, un enrichissement de la fonction « apoptose » signifie que, parmi tous les gènes dont l'expression est modifiée, la proportion des gènes impliqués dans ce processus est plus importante que la proportion attendue si les gènes impactés étaient pris au hasard.

6. HISTOLOGIE

La fixation permet d'éviter la lyse cellulaire après prélèvement, tout en préservant la structure de l'organe et les macromolécules. Elle conserve les antigènes nécessaires pour un traitement immunohistochimique et peut aussi augmenter la rigidité du tissu pour faciliter sa coupe.

A. Fixation paraformaldéhyde 4 %, inclusion, coupes

Ce fixateur est préparé avec 2 grammes de poudre de paraformaldéhyde (Sigma) dissout à chaud dans 50 ml de PBS1X (tablettes, Sigma) préalablement traité au DiEthylPyroCarbonate (DEPC, Sigma). Le DEPC a pour fonction d'inhiber les RNases. Une solution d'eau DEPC 1‰ est préparée. Après une nuit, la solution est passée à l'autoclave pour inactiver le DEPC. Le PBS DEPC est préparé en ajoutant 2 tablettes de PBS Sigma. Le paraformaldéhyde chauffé peut dégager des vapeurs de formaldéhyde, classé cancérigène de catégorie 1, et doit donc être manipulé sous hotte. Le pH de la solution est ajusté à 9 pour une conservation optimale des ARN du tissu en vue de l'hybridation *in situ*. L'ovaire est plongé pendant 2 heures dans cette solution de fixation sur glace. Dans le cas du cerveau, il passe 24 heures dans le fixateur. Celui-ci, aqueux, est alors retiré et remplacé par une solution de sucrose 20% (Sigma), plus dense et moins aqueuse jusqu'à ce que l'organe « coule » au fond du tube, quand sa densité devient égale à celle de la solution. Il est ensuite inclus dans du Tissue Tek (Sakura, Labonord). Les cerveaux sont conservés en vue d'une étude ultérieure. Les ovaires sont coupés au cryostat (épaisseur 8 µm) et les coupes sériées sont montées sur des lames à puits préalablement traitées au TriEthoxySilylPropylAmine (TESPA, Sigma). Les lames ainsi préparées sont conservées à -20°C. Le TESPA est un adhésif, sa fonction est de favoriser l'adhérence des coupes de tissus sur la lame en verre qui leur sert de support. Les lames de verre brutes sont baignées dans une solution d'acétone TESPA 4 %, puis dans 2 bains successifs d'acétone et 3 bains d'eau distillée (1 minute chacun) avant d'être séchées à l'étuve une nuit à 42 °C.

	Organes issus d'animaux de – de 6 jours	Organes issus d'animaux de + de 7 jours
Ethanol 70 % (1)	30 min	6 h
Ethanol 70 % (2)	30 min	6 h
Ethanol 90 %	30 min	5 h
Ethanol 100 % (1)	1 h	1 h
Ethanol 100 % (2)	1 h	1 h
Butanol (1)	15 min	2 h
Butanol (2)	1 h	5 h
Butanol (3)	15 min	4 h
Paraffine (1)	2 h	2 h
Paraffine (2)	> 2 h	> 2 h

Tableau 14: Programmes disponibles sur le Citadel (automate de déshydratation / enrobage).

	Durée des bains
Toluène (1)	10 min
Toluène (2)	10 min
Toluène (3)	10 min
Ethanol 100 % (1)	5 min
Ethanol 100 % (2)	5 min
Ethanol 95 % (1)	2 min
Ethanol 95 % (2)	2 min
Ethanol 90 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
Ethanol 60 %	2 min
Ethanol 50 %	2 min
H₂O	2 min

Tableau 15 : Programme disponible sur le Varistain (automate utilisé pour le déparaffinage et la réhydratation).

Tampon	Composition
PBS 10X	80g NaCl 9.5g Na ₂ HPO ₄ 2g KCl 2g KH ₂ PO ₄ H ₂ O qsp 1L pH 6.8
TBS 10X	24.2g Tris 80g NaCl 13ml HCl 37% H ₂ O qsp 1L pH 7.6
Tampon citrate	0.3g sodium citrate 100 ml H ₂ O pH 6
Hémalun de Masson	10 g aluminium potassium sulfate 1 g hémateïne 500 ml H ₂ O 10 ml acide acétique glacial

Tableau 16 : Préparation des tampons et solutions utilisés en immunohistochimie.

B. Fixation Bouin, inclusion, coupes

Ce fixateur est composé de 75% de solution aqueuse saturée d'acide picrique, 20% de formaldéhyde à 37% et 5% d'acide acétique. L'organe prélevé est déposé dans un tube 1.5 ml contenant 500 µl de liquide de Bouin (24 heures, +4°C). Ensuite, le fixateur est retiré et les organes sont déposés dans des cassettes d'inclusion avant d'être installés dans un automate de déshydratation et d'enrobage : le Citadel (dont les programmes sont présentés dans le tableau 14). Les organes sont plongés dans une succession de bains d'éthanol de concentration croissante qui éliminent les résidus de fixateur et déshydratent progressivement les tissus. Les bains de butanol achèvent la déshydratation et préparent à l'enrobage par immersion des organes dans des bains de paraffine liquide chauffée à 56°C. La durée des bains dépend de la taille des organes, plus il y a de tissus et plus les étapes sont longues. Les organes sont ensuite inclus dans des cubes de paraffine. Ils sont orientés sous loupe binoculaire de façon à obtenir à chaque fois la même incidence de coupe au microtome. Dans le cas d'organes très petits (tels que les ovaires néonataux), ils peuvent subir après les bains d'éthanol 70% une légère coloration dans de l'éthanol 90 % - éosine. Cet aspect rosé permet ensuite de repérer l'organe au sein du bloc de paraffine qui s'opacifie en refroidissant. Les blocs ainsi obtenus sont coupés au microtome. Les coupes ont une épaisseur de 5 µm et sont montées (une coupe sur cinq, cinq fois) dans de l'eau albuminée sur des lames de verre traitées au TESPA et conservées à 4°C. Les ovaires adultes sont également coupés (5 µm) et montés une coupe sur 10 sur des lames traitées au TESPA.

C. Immunohistochimie

Il s'agit d'un marquage protéique reposant sur le principe de détection antigénique. Il est effectué ici sur les lames portant des coupes d'organes fixés dans le liquide de Bouin et inclus en paraffine.

Réhydratation des coupes, démasquage et saturation

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées dans un automate (Varistain, dont le programme est présenté par le tableau 15) par des bains successifs de toluène et éthanol de titre décroissant. Ensuite les coupes subissent un démasquage d'épitopes (pour revue, D'Amico *et al.*, 2009) (un pré-traitement permettant de rendre les épitopes accessibles en améliorant leur conformation spatiale par rupture des liaisons moléculaires créées par le fixateur qui les modifie, réduisant l'accessibilité

Anticorps primaire			Anticorps secondaire			Amplification	Révélation	Montage
Nom	Fournisseur	Dil.	Nom	Fournisseur	Dil.			
Ybx2 Msy2	Santa Cruz (SC 21316)	1/100	Anti-chèvre biotinylé	Dako	1/500	ABC	DAB	Permanent
			Anti-chèvre Alexa-fluor 488	Invitrogen	1/500	-	-	Vectashield +DAPI
GENA clone TRA98	Clinisciences (RK-73-004)	1/50	Anti-rat HRP	Amersham	1/200	-	DAB	Permanent
FN	Sigma (F3648)	1/100	Anti-lapin Alexa fluor - 594	Invitrogen	1/500	-	-	Vectashield +DAPI
			Anti-lapin biotinylé	Dako	1/500	ABC	AEC	Aqueux
Ccasp3	Cell Signaling Technology (#9661)	1/50	Anti-lapin biotinylé	Dako	1/500	ABC	DAB	Permanent
Foxo3a FKHRL1	Santa Cruz (SC 9813)	1/25	Anti-chèvre biotinylé	Dako	1/500	ABC	DAB	Permanent
PCNA	Dako (M0879)	1/500	Anti-souris biotinylé	Dako	1/500	ABC	DAB	Permanent
			Anti-souris Alexa-fluor 488	Invitrogen	1/500	-	-	Vectashield + DAPI

Tableau 17 : Anticorps utilisés.

Dil. = dilution. Les anticorps primaires sont dilués dans un diluant industriel (Dako S0809), les anticorps secondaires sont dilués dans du PBS 1X.

des anticorps). Ce démasquage (45 minutes à 80°C dans un bain de tampon citrate 10 mM, pH6) facilite donc le marquage par l'anticorps. La solution est ensuite ramenée à température ambiante avant de plonger les lames dans du PBS 1X (tableau 16). Le blocage des sites aspécifiques est réalisé avec une solution de PBS-BSA (Sigma) 10%, une heure à température ambiante. Cette étape vise à saturer les sites aspécifiques peu réactifs mais capables malgré tout de créer des liaisons de faible affinité avec de nombreux produits utilisés au cours du marquage.

Anticorps et amplification

Les lames sont à nouveau rincées dans du PBS 1X avant de recevoir l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans du Dako RealTM antibody diluent (Dako S2022) comprenant un agent bloquant (incubation à 4°C durant une nuit). Les différents anticorps utilisés dans le cadre de cette thèse sont présentés dans le tableau 17. Après rinçages dans du PBS 1X, un anticorps secondaire synthétisé chez l'espèce utilisée pour la production de l'anticorps primaire est déposé sur les lames. Il est dilué dans du PBS 1X. Il va reconnaître spécifiquement la partie constante de l'anticorps primaire et permettre la révélation par coloration parce qu'il est couplé à une peroxydase (figure 46 A, page suivante) ou à de la biotine (figure 46 B). Une amplification du signal par le complexe ABC Avidin-Biotin Complex, (Vectastain elite ABC Kit, Vector Labs, PK-6100) est alors nécessaire. Ce kit contient de l'avidine, à forte affinité pour la biotine, couplée à des peroxydases qui peuvent alors réagir avec la diaminobenzidine (DAB) et produire un précipité coloré stable.

Révélation, contre-coloration, déshydratation et montage

La DAB (3-3' diaminobenzidine tétrahydrochloride, Sigma, D7304) oxydée par les peroxydases portées par les anticorps secondaires, se colore en brun. L'hémoglobine ayant une activité peroxydase endogène, les hématies peuvent également être légèrement marquées à la DAB. Les lames révélées sont rincées au PBS 1X et contre-colorées (1 min dans l'Hémalun de Masson (solution à l'hématoxyline préparée au laboratoire, préparation tableau 16 voir page 152), rinçage dans l'eau, 1 min dans une solution de carbonate de lithium (Sigma) à saturation qui neutralise les charges en présence, faisant changer l'hématoxyline de couleur). Enfin, les coupes sont déshydratées par bains successifs dans l'éthanol 95 %, l'éthanol 100 % et 2 bains de toluène (une min chacun) et montées sous lamelle dans un milieu hydrophobe permanent : la résine Eukitt® (Kindler).

D. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est un marquage d'ARNm. À l'origine l'hybridation est développée pour marquer des ADN fixés sur une membrane à l'aide d'une sonde ARN (Gillespie & Spiegelman, 1965). Puis la technique est utilisée sur des coupes de tissus (Orth *et al.*, 1971). Les sondes sont alors couplées à un élément radioactif pour permettre une révélation par autoradiographie. Cette technique de marquage « chaud » est contraignante d'abord parce qu'il faut manipuler de la radioactivité et ensuite parce que l'étape de révélation est très longue. Le marquage « froid » est développé au

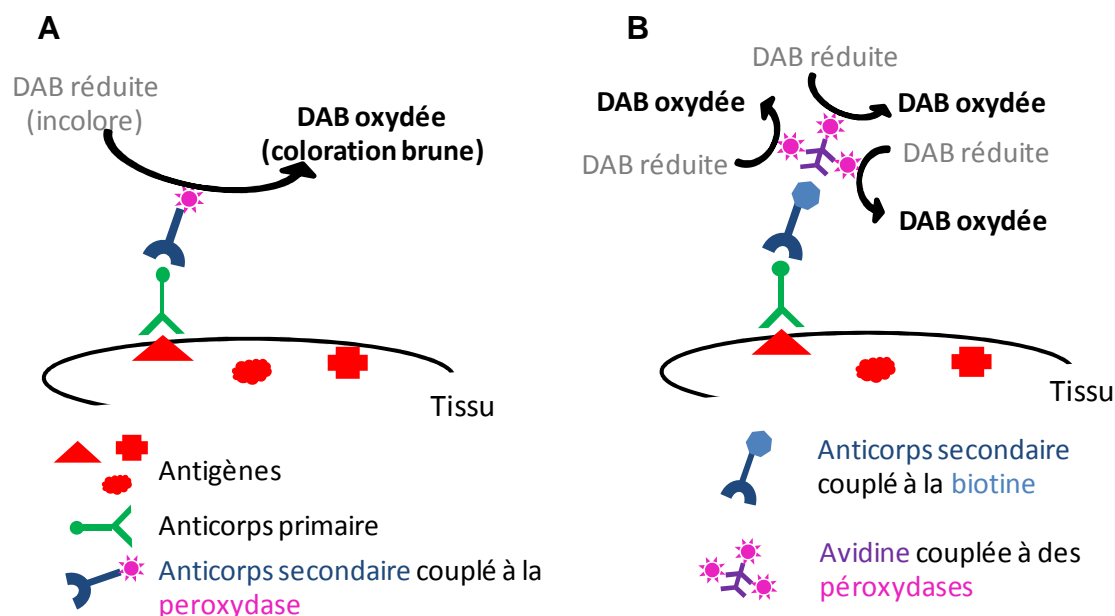


Figure 46 : Immunohistochimie

A : Marquage sans amplification. L'anticorps primaire reconnaît l'antigène d'intérêt puis est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui, en présence de son substrat (Diaminobenzidine, DAB), forme un précipité brun. **B** : Marquage avec amplification. L'anticorps primaire reconnaît l'antigène d'intérêt puis est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à de la biotine. Il faut ensuite ajouter de l'avidine (à forte affinité pour la biotine) couplée à une enzyme qui, en présence de son substrat, DAB forme un précipité brun.

Gène	Séquences amorfes (5'-3')	Position et n° accession	Taille amplicon
Actba	F : TGCAGGCTAGGCAGTCTGAA R : TCCATTGCTCTGGGACCTG	1040-1483 de NM_37482	443
Amh	F : ACCCCTTCCTAGAGACCCTCA R : CACCACGTGGTTCCCGTAGC	5388-6049 de NM_012902.1	725
Cyp19a1	F : TGGATGGGGATTGGAAGTGCCTG R : CACGTTCTCCTTTGTCAGGTCTCC	797-1487 de NM_33936	691
Dpp6	F : TACTGTGCCCATGTTGGAAA R : GGCAGGTCCTCTGTGCTTAG	549-1285 de NM_022850	736
Ednrb	F : CTGTGGGGATCACAGTGTG R : CAGCAGCACAAACACGACTT	551-1211 de NM_017333	661
Gdf9	F : GGCATTTCCCAGCAGATTCCTG R : CTCCTTTACCACAAGGTCACAC	3-546 de NM_021672	544
H3f3b	F : TACCCTTCCAGAGGTTGGTG R : CAAGACTCCCCACCACTTGT	194-973 de NM_053985	779
Inha	F : ATGGTGATCCAGCCGTCTCT R : CAAGGACACAGGCACAGCCAT	256-765 de NM_012590.1	510
Isyna1	F : ATTGGCTCTGGCCTCAAGAC R : GCCTTCACCTCTTCTGGCTT	1060-1667 de NM_001013880	608
Nobox	F : ATGTTCTTGGCAGTGACAGCA R : TTGGCTGCAGCAAGATCTGAC	908-1255 de NM_001192013	348
Psmb9	F : CATCATGGCTGTGGAATTTG R : GGTAATGACACCCCACTG	66-583 de NM_012708	518
Rrm2	F : GCACTGGGAAGCTCTGAAAC R : GGCTTGTGTACCAGGTGCTT	396-886 de NM_001025740	510
Sgk1	F : GCGCAATGTTCTGTTGAAGA R : CCTCTTGGTCCGGTCCTT	141-721 de NM_001193568	580

Tableau 18 : Couples d'amorces utilisés pour la synthèse de ribosondes d'HIS. La taille des amplicons est indiquée en bases.

milieu des années 70 et utilise des sondes couplées à la biotine (Manning *et al.*, 1975) mais la révélation utilise le même système enzymatique qu'en immunohistochimie et l'activité peroxydase endogène des tissus génère un important bruit de fond. La biotine est alors remplacée par de la digoxygénine permettant une révélation à l'aide d'une phosphatase alcaline (Herrington *et al.*, 1989). La plupart des sondes utilisées ont été synthétisées pour cette étude (liste en tableau 18). D'autres sondes étaient déjà présentes au laboratoire : Msy2 (marqueur ovocytaire, non présenté dans la liste, les séquences de ses amorces figurent dans l'article « *Systemic compensatory response to neonatal estradiol exposure does not prevent depletion of the oocyte pool in the rat* ») et Inha (marqueur des cellules de la granulosa Guigon *et al.*, 2003a).

i. Synthèse de ribosondes

Des amorces de PCR correspondant à un gène d'intérêt (marqueur des cellules germinales, marqueurs de croissance...) sont dessinées grâce au logiciel libre (Primer3) en fonction de la séquence du gène présente dans les bases de données (NCBI gene). Après un alignement de séquences multi-espèces, les amorces sont choisies dans des zones conservées par l'évolution. La taille de l'amplicon doit être grande (généralement entre 500 et 900 bases) car plus l'amplicon généré est long, plus la sonde qui en découlera portera de molécules de digoxygénine nécessaires au marquage et ceci facilitera sa détection en amplifiant la réaction de révélation. Les séquences des amorces «forward» et «reverse» doivent avoir une quantité de bases AT et GC similaire afin que leurs températures optimales d'hybridation soient compatibles. Les amorces sont testées en PCR (figure 47, page suivante) sur des ADNc issus d'animaux chez lesquels le gène correspondant est exprimé. Le produit de PCR est ensuite séquencé (MWG Operon). Puis il est purifié (à l'aide de Kits QIAGEN selon les instructions du fournisseur) et intégré à l'aide d'une ligase dans un plasmide pGEM-T easy (Promega). Le plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline, un site multiple de clonage (site reconnu par de nombreuses enzymes de restriction) et est ouvert sur le site de son gène Lac Z, avec des extrémités Thymine disponibles permettant l'insertion du produit de PCR d'intérêt qui porte à son extrémité une base Adénine. Ce plasmide est ensuite introduit par transformation dans des bactéries compétentes XL 1blue (Invitrogen) grâce à un choc thermique. Puis les bactéries sont mises en culture dans du milieu SOC (Invitrogen) à 37°C dans un incubateur-agitateur (1 heure, 180 rpm (New Brunswick)). La pré-pousse obtenue est mise en culture sur gélose (25g/L LB -Luria Broth, Sigma- ; eau ; 15 g/L agar -Eurobio) contenant 40 µl de X-Gal [20 mg/ml] et 40 µl d'IPTG [20 mg/ml] (Promega), à 37°C pendant une nuit.

Les clones d'intérêt obtenus sont reconnaissables à leur couleur blanche parce que l'insert interrompt le gène Lac Z responsable de la métabolisation du X-gal produisant la couleur bleue. Ils sont prélevés et remis en culture dans du milieu LB contenant de l'ampicilline [100 µg/ml] pour s'assurer que les bactéries ne perdent pas leur plasmide en cours de culture, une nuit à 37°C avec agitation. Une petite quantité de la pousse est soumise à une MINIpip (kit QIAGEN, selon les instructions du fournisseur) : le kit sert à extraire le plasmide, qui est ensuite digéré par des enzymes de restriction possédant un site de coupure dans le site multiple de clonage du plasmide (ou à une extrémité de l'insert) afin d'en vérifier la taille par électrophorèse. La totalité de la pousse

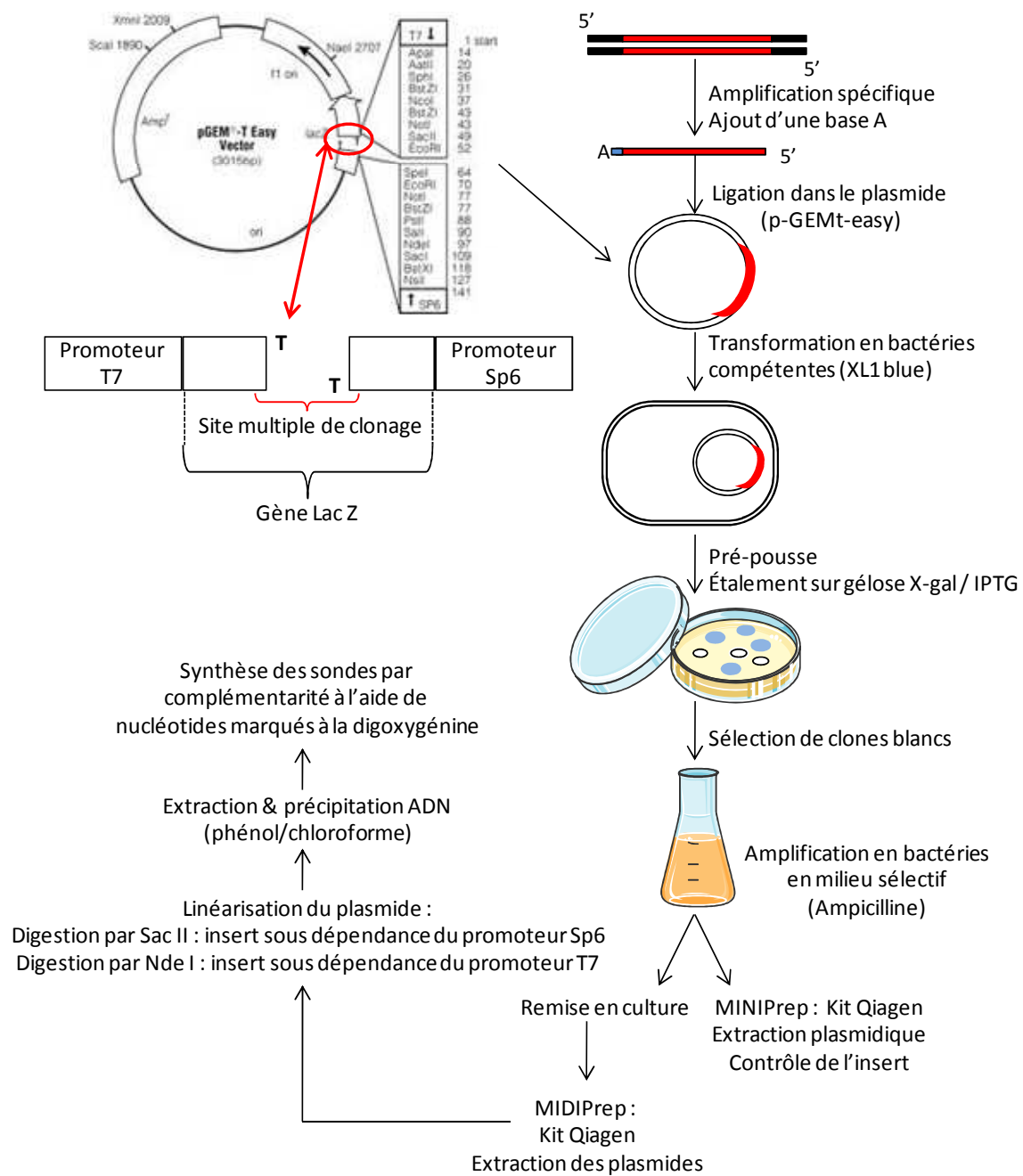


Figure 47 : Synthèse ribosondes pour HIS

Grâce à la complémentarité A/T, les produits de PCR peuvent s'intégrer dans un plasmide à bout T sortant, lui-même introduit dans une bactérie compétente. Si ces étapes fonctionnent, les bactéries hôtes deviennent incapables de métaboliser le X-gal mais sont résistantes à l'ampicilline. Les plasmides sont ensuite extraits et linéarisés puis purifiés avant de servir de matrice pour la synthèse des ribosondes marquées à la digoxigénine.

bactérienne est alors soumise à une MIDIprep (kit QIAGEN, selon les instructions du fournisseur) pour extraire et purifier le plasmide en grande quantité (et éliminer notamment l'ADN chromosomique bactérien). La quantité d'ADN est dosée par spectrophotométrie à 260 nm (Nanodrop). Le plasmide purifié subit une nouvelle électrophorèse de contrôle avant d'être linéarisé : il est digéré par une enzyme de restriction possédant un site unique de coupure dans le site multiple de clonage (pas dans l'insert). L'ADN est ensuite purifié et précipité : un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique est ajouté au produit de MIDIprep digéré. Après avoir été vortexé et centrifugé à vitesse maximale, la phase aqueuse supérieure est récupérée, additionnée de 100 µl de chloroforme/alcool isoamylique pour retirer les traces de phénol, vortexée, centrifugée. La phase aqueuse supérieure est à nouveau récupérée, additionnée d'acétate de sodium (3M pH5.2) et de trois volumes d'éthanol 100% pour précipiter l'ADN. Après une nuit à -20°C, le mélange est centrifugé -toujours à vitesse maximale- 30 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol 70%, repris dans de l'eau [500 ng/µl] et conservé à -20°C.

Les sondes ARN sens (témoin négatif) et antisens (sonde test) sont synthétisées par transcription *in vitro* à partir du plasmide linéarisé en présence d'ARN polymérases SP6 ou T7 et de nucléotides marqués à la digoxygénine pendant 2h à 37°C (Roche). L'ADN matrice est digéré par la DNase I (Roche) 30 min, à 37°C. Les sondes ARN sont précipitées à l'aide de chlorure de lithium et deux volumes d'éthanol 100%. Après une nuit à -20°C, le mélange est centrifugé à vitesse maximale 30 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol 70%, repris dans de l'eau et conservé à -20°C.

ii. *Hybridation in situ*

La verrerie utilisée en hybridation ne doit pas être contaminée par des RNAses. Pour s'en assurer, elle est chauffée au préalable 1h30 à 180°C au four. Les tampons et solutions sont préparés avec de l'eau DEPC. La composition des différents tampons et solutions est détaillée dans le tableau 19, page suivante.

Les lames portant les coupes de tissu à hybrider sont décongelées à 42°C sur une platine chauffante, puis plongées dans un bain de chloroforme (30 secondes, pour éliminer les lipides des tissus), trois bains de PBS 1X pH 7.3 (3 x 5 min, pour les réhydrater), deux bains de TEA (Triéthanolamine 18.5 g/L, 2 x 5 min). Dans chaque bain de TEA, on ajoute goutte à goutte 250 µl d'anhydride acétique sous agitation. Celui-ci bloque les groupements amines réactifs du tissu afin d'empêcher les hybridations aspécifiques. Ensuite les lames sont plongées dans deux bains successifs de 2X SSC (2 x 5 min). Les coupes sont couvertes d'une goutte de tampon de pré-hybridation, pendant 2 heures à 55°C, dans une cuve noire à saturation de vapeurs de formamide afin d'abaisser la température d'hybridation optimale pour qu'elle soit compatible avec la conservation des tissus.

Les sondes d'hybridation sont ensuite diluées dans le tampon d'hybridation, dont la constitution est semblable à celle du tampon de pré-hybridation, à l'exception de l'EDTA et de l'ADN de sperme de saumon (tableau 19). Le facteur de dilution des sondes dépend de leur qualité, de l'abondance de leur cible dans le tissu et de leur conformation afin d'assurer lors de la révélation un signal optimal. Il

Solution	Composition
TEA	3.7g triéthanolamine poudre 200ml H ₂ O DEPC pH 8
20X SSC	87.66g NaCl 44.11g Na ₃ citrate 2H ₂ O (trisodium dihydraté) H ₂ O DEPC qsp 500ml pH 7
Tampon de pré-hybridation	1 ml Formamide désionisé (Sigma) 200µl 20X SSC 100µl Denhardt's solution stock 100X 5µl Yeast tRNA (solution Sigma, 20mg/ml) 40µl EDTA 200mM pH 8 100µl Dextran stock 50% (saturation des sites aspécifiques, Sigma) 360µl H ₂ O pure (Eurobio) 200µl d'ADN de sperme de saumon à 2.5mg/ml
Tampon de saturation	25% 20X SSC 25% H ₂ O 50% formamide
Denhardt 100 X	1g Ficoll400 1g polyvinylpyrrolidone 1g BSA 50 ml H ₂ O
NTE	NaCl 500mM Tris 10mM EDTA 5mM pH 7.5
0.1X SSC-30% formamide	69.5 ml H ₂ O 30 ml formamide 500µl 20X SSC
T1	100 ml Tris 1M 30ml NaCl 5M H ₂ O qsp 1L pH 7.5
T2	57 ml T1 3 ml agent bloquant 10% (Boehringer 1096176)
T3	100 ml Tris 1M 20 ml NaCl 5M pH 9.5
Solution de révélation	3.6ml T3 complet 24µl levamisole (Sigma) 14µl BCIP (BromoChloroIndolyl, Roche) 17.2 NBT (NitroBlue Tetrazolium, Roche)

Tableau 19 : Préparation des tampons et solutions utilisés en hybridation *in situ*.

est déterminé de façon empirique dans des expériences pilotes. Il est en général de 100, sauf dans le cas de Msy2 (400). Les sondes diluées sont placées 3 minutes à 65°C afin de les dénaturer, puis immédiatement sur glace afin d'éviter les ré-appariements et enfin déposées sur les coupes et laissées une nuit à 55°C dans une cuve à saturation de vapeurs de formamide.

Le lendemain, les lames sont rincées (2 x 5 min) dans du 2X SSC puis traitées à la RNase A qui dégrade les ARN simple brin (3 ml de tampon NTE +12µl de RNAses à 20µg/ml, 30 min, 37°C). Les lames sont rincées dans du 2X SSC (3 x 5min) puis dans du 0.1X SSC-30% formamide préchauffé au bain marie à 60°C (en conditions stringentes, 1 heure), puis dans un bain de 5 minutes de tampon T1 avant un bain de 2 heures à température ambiante dans du tampon T2 (contenant un agent bloquant). Ensuite les coupes sont recouvertes d'une solution d'anticorps anti-digoxygénine couplés à une phosphatase alcaline (anticorps anti-DIG Roche dilué au 1/500 dans T2, 2 heures à 37°C). Cette incubation est suivie de trois bains successifs de 5 min dans du tampon T1 (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris, pH 7) et deux bains de 10 min dans du tampon T3 complet (T3 MgCl₂ 50mM extemporanément). Le tampon T3 est plus alcalin que le T1 pour permettre l'action de la phosphatase alcaline. Enfin, la solution de révélation est déposée sur les coupes. Le levamisole qu'elle contient inhibe les phosphatases alcalines endogènes, tandis que le BCIP et le NBT sont des substrats de la phosphatase alcaline. La solution de révélation reste sur les coupes une nuit à température ambiante à l'obscurité. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS 1X et peuvent être montées dans un milieu Glycérol Gélatine. Si une immunofluorescence ou un TUNEL est envisagé, les lames sont séchées et conservées à 4°C (maximum une semaine) si elles ne sont pas traitées immédiatement.

E. Couplage HIS / IHC (IF)

En immunofluorescence, les lames sont rincées et réhydratées dans du PBS 1X (ou utilisées pour des doubles-marquages après une HIS) puis mises en contact une nuit à +4°C avec un anticorps primaire (comme en immunohistochimie classique). Les lames sont rincées dans du PBS 1X puis mises en contact durant 2 heures avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Après de nouveaux rinçages au PBS 1X, les lames sont montées sous lamelle dans un milieu de montage évitant l'affadissement de la fluorescence et contenant un intercalant fluorescent des acides nucléiques (DAPI, pour marquer les noyaux, Vectashield, Vector Labs). Elles sont conservées à +4°C.

F. Marquage des cellules en apoptose

Trois techniques de détection de l'apoptose par mise en évidence de la fragmentation de l'ADN survenant en fin de processus ont été utilisées selon l'objectif de l'expérience. Le comparatif de ces trois techniques est présenté dans le tableau 20, page suivante.

i. *Terminal deoxynucleotidyl transférase (TdT) dUTP Nick End Labeling (TUNEL)*

Cette méthode (In Situ Cell Death Detection kit, POD. Roche) permet la détection de l'apoptose par marquage des extrémités des fragments d'ADN générés au cours de la mort cellulaire. La transférase (TdT) catalyse l'ajout de nucléotides couplés à des peroxydases à ces extrémités d'ADN 3' dégagées et une révélation à la DAB permet d'identifier les cellules en apoptose, colorées en brun.

TUNEL paraffine	TUNEL cryocoupe	Apoptag paraffine
Intensité de marquage +++ Bruit de fond +++	Intensité de marquage ++ Bruit de fond -	Intensité de marquage + Bruit de fond -
Protocole : Déparaffinage (1h) Démasquage (1h) Inhibition peroxydases endogènes (1h) Marquage fluorescéine (1h) Anticorps anti-fluorescéine couplé peroxydase (ON) ⇒ Très long	Protocole : x x x Marquage fluorescéine (1h) x ⇒ Court	Protocole: Déparaffinage (1h) Démasquage (1h) Inhibition peroxydases endogènes (1h) Marquage à la DIG (1h30) Anticorps anti-DIG (1h) ⇒ intermédiaire
Révélation : DAB / AEC	Révélation : fluorescence	Révélation : DAB / AEC
Marquage stable	Marquage instable	Marquage stable
Permet double marquages propres	Permet la colocalisation	Permet les comptages cellulaires

Tableau 20 : Comparatif des techniques de détection apoptose

Le choix de la technique de détection de l'apoptose est guidé par l'objectif de l'expérience :

Le TUNEL en paraffine fournit un marquage fort mais avec beaucoup de bruit de fond atténué par un second marquage (apoptose + marqueur de la membrane basale)

Le TUNEL sur cryocoupe est visible en fluorescence, idéale pour les études de colocalisation (apoptose + marqueur de cellule germinale)

L'Apoptag sur paraffine produit un marquage faible mais sans bruit de fond autorisant les comptages cellulaires en microscopie à lumière blanche

ON : *overnight*, une nuit

DAB : Diaminobenzidine

AEC : Amino-Ethyl-Carbazol

DIG : Digoxygénine

- Sur coupes en paraffine

Après déparaffinage et réhydratation, les lames sont immergées dans un bain de méthanol H₂O₂ 1% (3 x 20 min à température ambiante) afin d'inhiber les peroxydases endogènes qui génèrent du bruit de fond lors de la révélation. Ensuite, elles sont plongées dans un bain de tampon citrate 10 mM pH 6 à 80°C pendant 45 min, puis après retour à température ambiante elles sont rincées au PBS 1X et mises en contact avec la solution de marquage (dNTP couplés à de la fluorescéine isothiocyanate) et l'enzyme (terminal deoxynucleotidyl transferase). Après incubation (1 heure, 37°C), les coupes sont rincées au TBS 1X (pour rappel, tableau 15 page 152) et recouvertes d'un mélange de POD converter (un anticorps anti-fluorescéine couplé à une peroxydase) et de PBS 1X-BSA 4%-SVF 4% afin de bloquer les sites aspécifiques. Les coupes restent immergées une nuit, à 4°C, puis elles sont rincées au TBS et révélées à la DAB, contre-colorées, déshydratées et montées sous lamelle dans de la résine Eukitt® (Kindler).

- Sur coupes congelées

Les lames d'HIS sont postfixées dans du paraformaldéhyde 4 % durant 30 min à 4°C. Puis elles sont mises en contact avec le mélange réactionnel du TUNEL pendant une heure à 37°C, rincées et montées en milieu Vectashield avec DAPI pour une lecture en fluorescence. Cette technique ne nécessite pas d'anticorps secondaire car la fluorescéine contenue dans le mélange réactionnel a des propriétés fluorescentes.

ii. Apoptag

Après déparaffinage et réhydratation, les lames subissent un démasquage d'épitopes (voir section « immunohistochimie » page 153) puis après retour à température ambiante, elles sont immergées dans un bain de PBS 1X - H₂O₂ 3% (15 min à température ambiante) afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les coupes subissent ensuite le marquage des cellules en apoptose selon les instructions du fournisseur (kit S1700, Millipore). Ce marquage repose sur la même technique que le TUNEL : les lames sont couvertes d'un mélange réactionnel contenant un quart de solution d'enzyme TdT et des dNTP couplés cette fois à la digoxygénine durant 1h30 à 37°C, puis elles sont rincées avec un tampon de lavage dilué dans l'eau et du PBS 1X. Un anticorps anti-digoxygénine est appliqué pendant 1 heure à température ambiante. Les lames sont ensuite révélées, contre-colorées, déshydratées et montées comme dans le cas d'une immunohistochimie classique.

G. Acquisition d'images et comptages cellulaires

Les lames d'HIS et HIS couplée à de l'immunofluorescence ou TUNEL sont observées puis photographiées sur un microscope à fluorescence (AxioImagerM1 Zeiss) à l'aide du logiciel Axiovision Rel 4.7.1.

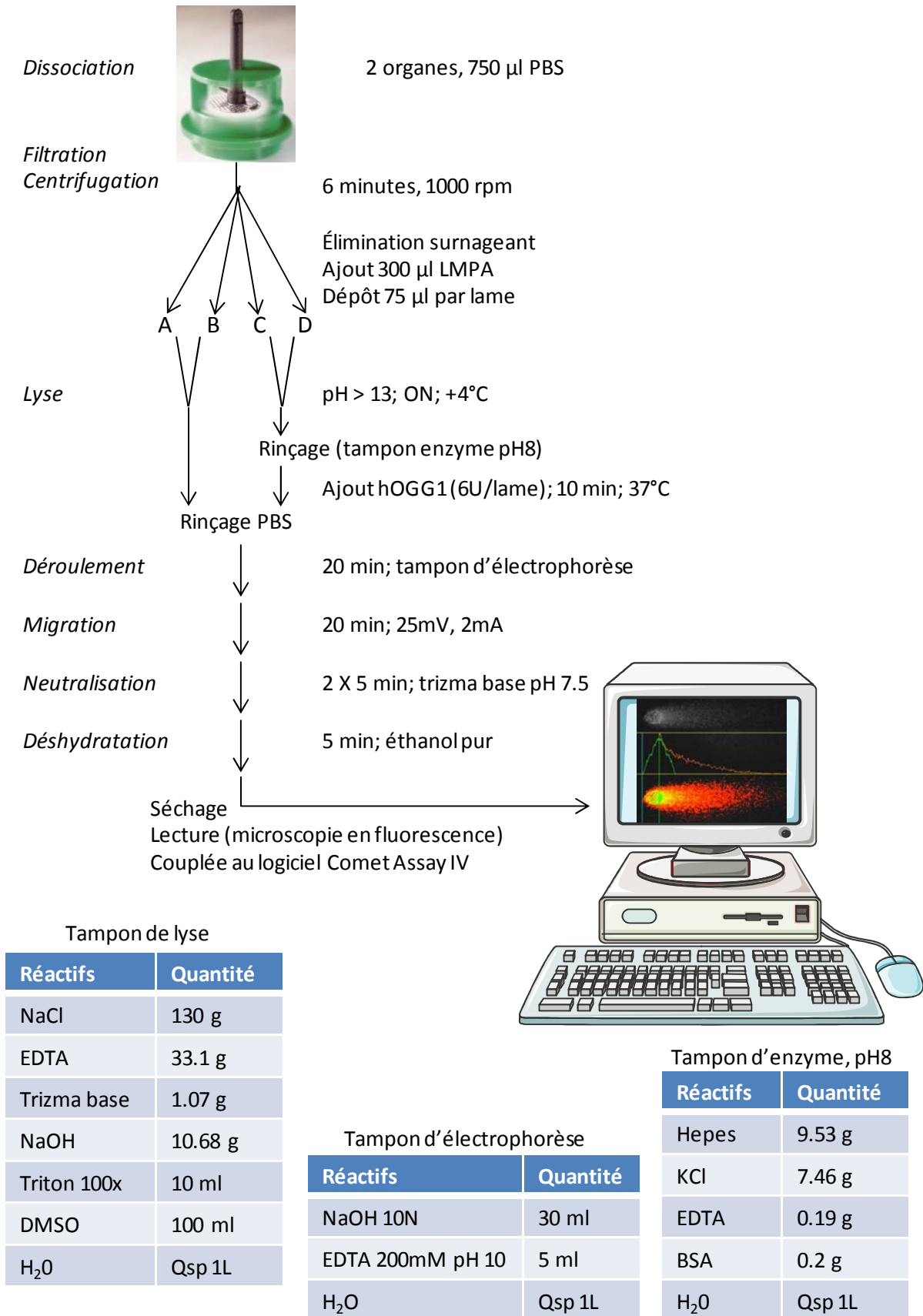


Figure 48 : Test des comètes

Après récupération, les cellules de l'ovaire subissent une dissociation mécanique avant d'être mélangées à du LMPA (Low Melting Point Agarose) puis déposées sur des lames de verre portant déjà 2 couches de gel d'agarose. Les cellules sont ensuite lysées à pH alcalin pour exposer leur ADN. Les lames sont traitées ou non avec une enzyme de réparation de l'ADN spécifique de certains sites endommagés par les ERO. Puis l'ADN subit une étape de déroulement afin de rendre accessibles tous les fragments générés qui peuvent alors migrer. Après neutralisation et déshydratation, les lames sont « lues » grâce à l'ajout d'un intercalant de l'ADN avec un microscope à fluorescence couplé à un logiciel d'acquisition des données.

Le comptage des ovocytes totaux néonataux est réalisé après leur marquage par TRA98, un marqueur nucléaire des cellules germinales (Tanaka *et al.*, 1997). Compte tenu de la grande densité des cellules germinales accolées les unes aux autres aux âges considérés (0, 1, 2 et 3 jpn), un marqueur cytoplasmique (par exemple Ybx2, approprié sur les coupes issues d'ovaires adultes) ne permettait pas de les différencier individuellement et risquait de biaiser le comptage. Bien que TRA98 s'atténue avec le développement folliculaire (il disparaît presque dans les ovocytes des follicules primaires), ce marqueur nucléaire était donc le plus adapté à notre étude pendant la période d'histogenèse folliculaire. Le comptage des ovocytes non marqués par TRA98 est basé sur la reconnaissance de la structure des follicules dans lesquels ils sont inclus. La combinaison de ces deux critères (expression d'un marqueur nucléaire des cellules germinales et / ou critère morphologique d'appartenance à une structure folliculaire) permet un comptage de tous les ovocytes présents sur une coupe histologique. Afin d'obtenir une estimation du nombre total d'ovocytes par ovaire néonatal, les organes ont été coupés (5 µm d'épaisseur) et une coupe sur 5 a été comptée. Ainsi aucun ovocyte n'est compté deux fois et l'estimation est basée sur la totalité de l'organe. Le comptage des lames d'IHC se fait sur un microscope couplé à un logiciel de stéréologie : CastTM (Olympus France, microscope Olympus BX51, Prior Proscan, Microcator Heidenhein). Ce système fournit une aide au comptage de cellules mais aussi la possibilité de mesurer la surface des coupes et ainsi de faire une estimation du volume de l'organe par mesure de la superficie de chaque coupe multipliée par son épaisseur (soit 5 µm) et le nombre de coupes séparant 2 coupes mesurées (soit 5).

Chez l'adulte en revanche les follicules ont été comptés sur une coupe sur 10. La taille des follicules en développement à l'âge adulte rend difficile le comptage parce qu'ils apparaissent sur plusieurs coupes et il faut donc s'assurer que chacun n'est compté qu'une fois. Étant donné la faible densité des cellules marquées à l'aide des autres marqueurs utilisés au cours de cette étude (TUNEL, Ccasp3, Foxo3), les comptages sont réalisés manuellement sur un microscope classique sans l'assistance de la stéréologie.

H. Test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

Ce test (figure 48) a été réalisé au sein du laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille, qui m'a accueillie dans le cadre d'une collaboration, avec l'aide de Smaïl Tallahari et Gonzague Dourdan (techniciens) et Fabrice Nesslany (directeur du laboratoire).

En 1976, Cook *et al.* décrivent un test permettant d'étudier les cassures de l'ADN en lysant les cellules dans une solution à pH 10 contenant des détergents et une forte concentration en sels (Cook *et al.*, 1976). Reprenant ce principe, Ostling & Johanson ajoutent à la lyse une étape de migration électrophorétique et observent les premières « comètes » (Ostling & Johanson, 1984). Puis en 1988, Singh *et al.* mettent au point le test en conditions alcalines tel qu'il a été utilisé ici (Singh *et al.*, 1988). L'ADN fragmenté migre sur un gel d'agarose de façon inversement proportionnelle à sa taille, formant la « queue de la comète » qui donne son nom au test. La sensibilité de ce test permet la détection de faibles taux d'ADN endommagé. Peu de cellules sont nécessaires à chaque échantillon d'analyse mais ces cellules doivent être parfaitement individualisées afin de ne pas rendre la lecture

et l'interprétation des résultats impossibles. En effet, le test repose sur une migration électrophorétique et des cellules non dissociées produiraient des « comètes » qui se chevauchent. Le protocole appliqué ici ainsi que la composition des différents tampons sont présentés en figure 48, page 164.

Les rattes nouveau-nées sont différenciées des mâles grâce à leur distance ano-génitale plus courte. Elles reçoivent 4 heures après leur naissance une injection sous-cutanée unique, soit d'une solution témoin négatif (huile), soit d'œstradiol (0.1 ; 1 ; 10 µg), soit d'une solution utilisée classiquement comme témoin positif Methylmethane sulfonate (MMS Sigma, #129925-5G, M4016, 75 mg/kg). [Voir figure 38 : stratégie expérimentale, page 132.] La voie d'exposition généralement utilisée dans le cadre de ce test *in vivo* est la voie intrapéritonéale mais dans un souci de cohérence expérimentale, nous avons préféré utiliser la voie sous-cutanée, comme dans le reste de l'étude. Par ailleurs, la biodisponibilité de l'œstradiol par voie sous-cutanée est la même que par voie intrapéritonéale (Liu *et al.*, 2007) confortant notre choix. Les ovaires de rattes sont récupérés 2 ou 24 heures après injection. Ils subissent un broyage mécanique décrit en 2009 pour la préparation de cellules testiculaires de rat (Rodriguez-Casuriaga *et al.*, 2009). Cette dissociation mécanique requiert un mediconTM, un dispositif composé de 2 cuves superposées. La cuve supérieure reçoit les deux ovaires de chaque animal dans 250 µl de PBS. Le fond de cette cuve est percé de petits trous bordés de lames qui désagrègent les tissus poussés à travers ce fond percé par une lame métallique mue par un rotor. Le rotor est entraîné lorsque le médicon est inséré dans un appareil (la médimachine), pendant 5 secondes. Les lames sont alors rincées avec 500 µl de PBS puis la suspension de cellules obtenue est récupérée dans la seconde cuve et filtrée à l'aide d'un filconTM (30 µm). Après centrifugation, le culot contenant les cellules est mélangé avec 300 µl de LMPA (Low Melting Point Agarose) 0.5 %, puis 75 µl de cette solution sont déposés sur les lames portant déjà une couche de Normal Agarose 1.5 % et une couche de Normal Agarose 0.8 %. Le tout est recouvert d'une lamelle. Chaque animal fournit deux lames destinées au test des comètes sans hOGG1 et deux lames destinées au test des comètes avec hOGG1. La human 8-hydroxyguanine DNA-glycosylase (hOGG) est une enzyme de réparation de l'ADN. Elle agit de façon spécifique en excisant les sites 8-oxoguanine, des bases modifiées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'ajout de cette enzyme lors du test des comètes va permettre de détecter les lésions dues au stress oxydatif en fragmentant l'ADN spécifiquement sur ces points (Smith *et al.*, 2006).

Toutes les lames sont ensuite soumises à une lyse cellulaire dans un tampon très alcalin (pH > 13) et riche en sels pendant une nuit. Cette lyse vise à éliminer les membranes, le cytoplasme, le nucléoplasme et les histones des cellules afin de rendre l'ADN accessible pour analyser les types de dommages qu'il porte. Des conditions de pH différentes permettent la mise en évidence de différents types de cassures de l'ADN: un pH alcalin détruit les liaisons hydrogène inter-chaines dans l'ADN, permettant ainsi la migration indépendante de chacun des deux brins et donc la révélation de cassures ne concernant qu'un seul brin. Le pH alcalin permet également de prendre en compte la cassure des sites alkali-labiles, zones de fragilité de l'ADN induites par la perte de base (site apurinique ou apyrimidique).

pH de la solution de lyse	Type de cassure détecté
7 < pH < 12.1	Cassures double brin
12.1 < pH < 12.6	Cassures simple brin + double brin
pH >12.6	Cassures simple brin + double brin + alcali-labiles

Les lames destinées au test avec hOGG sont ensuite rincées dans du tampon à pH 8 spécifique de l'enzyme. Elles reçoivent 75 µl d'enzyme (6 U/lame) et sont ensuite placées à 37°C pendant 10 minutes, puis rincées au PBS froid et disposées dans les cuves d'électrophorèse, avec les lames sans hOGG, sur glace pendant 20 minutes dans du tampon d'électrophorèse (pH > 13) sans être soumises aux champs électriques. C'est l'étape de déroulement, qui permet de libérer les fragments d'ADN générés. La migration de l'ADN (chargé négativement) est ensuite effectuée dans le même tampon, pendant 20 minutes à 25mV / 2mA. Puis les lames sont immergées 5 minutes successivement 2 fois dans du Trizma base (neutralisation) puis dans de l'éthanol pur (déshydratation). Enfin, elles sont séchées à l'air libre avant d'être observées au microscope. Le révélateur utilisé afin de visualiser l'ADN est l'iodure de propidium (30 µl à 20 µg/ml), un intercalant de l'ADN. Les lames sont lues sur un microscope à fluorescence couplé à un système de mesure et d'acquisition: le logiciel « Comet Assay IV » (Perceptive Instrument, UK). Ce logiciel fournit des informations sur la taille de la tête et la queue des comètes observées ainsi que le taux d'ADN qu'elles contiennent. La fluorescence émise est proportionnelle au taux d'ADN.

7. STATISTIQUES

Statistiques descriptives :

Dans chaque groupe de données (nombre d'ovocytes par ovaire, volume des organes, valeurs de qPCR...), les moyennes sont utilisées comme paramètre de position pour la représentation graphique des données. Le paramètre de dispersion qui l'accompagne est généralement le SEM (« Standard Error of the Mean »), calculé selon la formule $[s / (\sqrt{n-1})]$ où s est l'écart-type de la série et n l'effectif.

Inférence statistique :

Toutes les analyses statistiques utilisées au cours de cette thèse ont été réalisées grâce au logiciel Sigmatat® (Systat Software). Le logiciel permet de tester d'abord la normalité de la distribution des valeurs dans un échantillon (à l'aide du test de Shapiro-Wilk), ainsi que l'homogénéité des variances des différents échantillons en présence (à l'aide du test F de Fisher-Snedecor).

Si les valeurs des échantillons valident ces deux conditions (normalité des distributions et égalité des variances), l'utilisation de tests statistiques dits paramétriques est possible. Les tests paramétriques sont conduits sur les valeurs mêmes des échantillons.

- ANOVA : Analysis of Variance

La variabilité intra-échantillon est estimée par la variance. L'ANOVA a pour but de la comparer à la variabilité inter-échantillons. Si la variabilité inter-échantillons est supérieure à la variabilité intra-échantillon, cela signifie qu'au moins 1 des moyennes est différente des autres.

- Test post-hoc

Son rôle est d'identifier laquelle des moyennes est différente des autres. Il s'agit généralement d'un test LSD de Fisher (Least Significant Difference) ou d'un test de Tukey.

- Test t de Student

Il sert à comparer les moyennes d'échantillons 2 à 2.

Dans le cas où l'une des conditions (normalité des distributions ou égalité des variances) n'est pas respectée, l'utilisation de tests paramétriques est impossible. Il faut alors utiliser leurs équivalents non paramétriques, moins stringents.

- Test de Kruskal-Wallis

C'est l'équivalent non-paramétrique de l'ANOVA. Il s'agit d'un test de rang. Au lieu d'effectuer un test sur les valeurs brutes des échantillons, le logiciel attribue un rang à chaque valeur, indépendamment de son appartenance à un groupe et compare les sommes de ces rangs par groupe.

- Test post-hoc

Le test de Dunn est l'équivalent non paramétrique du test de Tukey.

- Test de Mann-Whitney

Équivalent non paramétrique du test t, il compare les moyennes 2 à 2.

Il est également possible d'étudier l'influence conjointe de deux variables indépendantes (telles que la dose et le temps) sur des séries de données. Une analyse de variance à deux facteurs est alors effectuée (« two-way ANOVA ») complétée par un test de Tukey.

Résultats

I. Exposition néonatale aux œstrogènes et conséquences à court terme sur leur métabolisme et l'histogenèse des follicules ovariens

Systemic compensatory response to neonatal estradiol exposure does not prevent depletion of the oocyte pool in the rat.

1. RÉSUMÉ

Lors de la naissance, l'animal se libère de l'imprégnation hormonale maternelle. Parallèlement, chez les rongeurs femelles, a lieu dans l'ovaire la formation des follicules, étape essentielle au bon déroulement de la vie reproductive de la future adulte. En effet, les cellules germinales groupées en amas bordés de cellules somatiques se réorganisent pour former les follicules, structures composées d'une cellule germinale unique entourée d'une assise de cellules somatiques, elle-même bordée par une membrane basale. Ce phénomène résulte de la mise en place de trois processus simultanés : l'avancement méiotique et l'apoptose d'une partie des cellules germinales ainsi que le remodelage de la membrane basale. L'exposition des animaux à des composés à activité œstrogénique au cours de cette période cruciale du développement altère de façon irréversible le déroulement de la formation des follicules, de façon différente selon l'espèce considérée. Cette étude a pour but de mieux comprendre les effets du 17 β -œstradiol (E2) sur leur propre métabolisme et sur la formation des follicules ovariens chez la ratte.

Nous avons donc répartis des nouveau-nées Sprague-Dawley en 5 groupes. Le premier groupe a reçu des injections sous cutanées d'huile de maïs (témoin négatif), les 4 autres groupes ont reçu des injections d'E2 à raison de 0.01 ; 0.1 ; 1 ou 10 μ g E2/jr. La première injection a été réalisée 4 heures après la naissance, la deuxième 24 heures plus tard et la dernière encore 24 heures après. Le sang de certains animaux a été récupéré chaque jour pour évaluer la dose d'E2 réellement circulante ainsi que la formation de ses métabolites. Par ailleurs, les ovaires des animaux ont été étudiés par immunohistochimie et hybridation *in situ* afin d'évaluer leur évolution histologique, le nombre d'ovocytes qu'ils contenaient, la vague d'apoptose liée à la formation des follicules et la répartition des récepteurs des œstrogènes. Des investigations en PCR quantitative ont également été menées pour suivre partiellement la mise en place des capacités métaboliques tant dans le foie (3 animaux par dose, travail en duplicats) que dans l'ovaire lui-même (au moins 3 pools de 6 à 12 ovaires, travail en duplicats) ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la progression méiotique et la formation folliculaire.

La mesure des taux hormonaux circulants a montré que l'animal développait très rapidement ses capacités d'élimination de l'excédent d'E2 mais les analyses quantitatives d'expression de gènes ont révélé que cet excédent entravait la maturation normale des gènes de détoxication, tant dans le foie que dans l'ovaire. Dans ce dernier, l'E2 diminue de façon dose-dépendante le nombre d'ovocytes présents à 3 jpn (soit à la fin de la période de formation des follicules). À la dose de 10 μ g/jr, outre la diminution de plus de 30 % du nombre d'ovocytes totaux, des ovocytes en apoptose ont été observés au sein de follicules déjà formés, soit en dehors des zones normales de fragmentation des

cordons ovariens, démontrant une perturbation du processus de formation folliculaire. Ceci entraîne la formation de follicules vides, dépourvus de leur cellule germinale éliminée après la constitution du follicule. En revanche, contrairement à ce qui a été rapporté chez la souris, le traitement n'induit pas la formation de follicules contenant plusieurs ovocytes (MOF).

2. PUBLICATION

Systemic Compensatory Response to Neonatal Estradiol Exposure Does Not Prevent Depletion of the Oocyte Pool in the Rat

Clémentine Chalme¹, Franck Giton^{2,3}, Frédéric Chalmel¹, Jean Fiet³, Bernard Jégou^{1,4}, Séverine Mazaud-Guittot^{1*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1085 Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail, Institut Fédératif de Recherche 140, Université de Rennes 1, Rennes, France, **2** AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, service de Biochimie et de Génétique, Créteil, France, **3** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U955 Équipe 07, Créteil, France, **4** Ecole des Hautes Études en Santé Publique, Rennes, France

Abstract

The formation of ovarian follicles is a finely tuned process that takes place within a narrow time-window in rodents. Multiple factors and pathways have been proposed to contribute to the mechanisms triggering this process but the role of endocrine factors, especially estrogens, remains elusive. It is currently hypothesized that removal from the maternal hormonal environment permits follicle formation at birth. However, experimentally-induced maintenance of high 17 β -estradiol (E2) levels leads to subtle, distinct, immediate effects on follicle formation and oocyte survival depending on the species and dose. In this study, we examined the immediate effects of neonatal E2 exposure from post-natal day (PND) 0 to PND2 on the whole organism and on ovarian follicle formation in rats. Measurements of plasma E2, estrone and their sulfate conjugates after E2 exposure showed that neonatal female rats rapidly acquire the capability to metabolize and clear excessive E2 levels. Concomitant modifications to the mRNA content of genes encoding selected E2 metabolism enzymes in the liver and the ovary in response to E2 exposure indicate that E2 may modify the neonatal maturation of these organs. In the liver, E2 treatment was associated with lower acquisition of the capability to metabolize E2. In the ovary, E2 depleted the oocyte pool in a dose dependent manner by PND3. In 10 μ g/day E2-treated ovaries, apoptotic oocytes were observed in newly formed follicles in addition to areas of ovarian cord remodeling. At PND6, follicles without any visible oocyte were present and multi-oocyte follicles were not observed. Our study reveals a major species-difference. Indeed, neonatal exposure to E2 depletes the oocyte pool in the rat ovary, whereas in the mouse it is well known to increase oocyte survival.

Citation: Chalme C, Giton F, Chalmel F, Fiet J, Jégou B, et al. (2013) Systemic Compensatory Response to Neonatal Estradiol Exposure Does Not Prevent Depletion of the Oocyte Pool in the Rat. PLoS ONE 8(12): e82175. doi:10.1371/journal.pone.0082175

Editor: Jae-wook Jeong, Michigan State University, United States of America

Received: July 12, 2013; **Accepted:** October 21, 2013; **Published:** December 16, 2013

Copyright: © 2013 Chalme et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: C. Chalme is funded by Region Bretagne (Doctoral research grant #10022). This study was funded by Inserm, University Rennes 1 (Déficits scientifiques émergents –2010) and Rennes Metropole (#10–705). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: severine.mazaud@univ-rennes1.fr

Introduction

Mammalian birth is characterized by dramatic endocrine changes and, in female rodents, this occurs concomitantly with crucial morphogenetic processes in the ovaries. The formation of ovarian follicles that occurs in the days following birth, will determine the whole reproductive life of the female. Although a fetus is likely to be exposed to high levels of steroids (in particular progesterone and estradiol [1,2]), the maternal liver and excretory organs manage their biotransformation and elimination. The fetus is also protected by the placental barrier and by binding proteins. Circulating steroids undergo a rapid decrease in the days following birth and reach nadir at the end of the first week until the newborn synthesizes its own steroids at the beginning of the infantile period [1–6]. This sudden release from maternal hormonal impregnation is associated with a rapid increase in the expression and activity of enzymes involved in hormone metabolism and detoxification machinery in the newborn liver [7,8]. As a consequence, the newborn acquires the capability to metabolize a variety of hormones and xenobiotics during the first week of life.

In the ovary, the formation of functional units (the follicles) from the immature fetal ovarian cords also takes place within the three days following birth [9,10]. Ovarian cords are composed of clusters of germ cells progressing through the first prophase of meiosis, surrounded by pregranulosa cells, and delineated by a continuous basal membrane. They fragment thanks to the deposition of a new basement membrane [11]. This fragmentation is associated with the separation of oocytes, which remained interconnected as nests or cysts during synchronous mitosis [9,10], and with a massive wave of degeneration specifically targeting oocytes resulting from both apoptotic and autophagic mechanisms [12–15]. A number of factors, mechanisms and pathways have been suggested to be involved in follicle formation. These include the endogenous meiosis clock, central signals and neurotrophic factor signaling, growth factor signaling (especially those of the transforming growth factor family) and transcription factors (for review, [10]). In addition, several studies have highlighted endocrine factors such as progesterone and 17 β -estradiol (E2) as candidate actors of follicle histogenesis in several species from mice,

rats to cattle and primates [4,16–18]. It is currently hypothesized that the decrease in maternal E2 impregnation that follows birth permits oocyte cyst breakdown, and consequently, follicle formation. Therefore, maintenance of high E2 levels or exposure to E2-mimicking molecules may result in inhibition of oocyte cyst breakdown. However, experimentally-induced high neonatal E2 levels have subtly-diverging immediate effects depending on the species (and even strains) in terms of oocyte survival and ovarian cord fragmentation, *i.e.* follicle formation. High post-natal E2 levels increase oocyte survival but inhibit follicle formation in mice [4,18]. However, they promote both follicle formation and oocyte survival in the hamster [19,20]. In the baboon, maintenance of maternal E2 levels are required for follicle formation since a treatment with an aromatase inhibitor leads to a sharp inhibition of the process [21]. In the rat, E2 moderately inhibits follicle assembly but increases primordial-to-primary follicle transition *in vitro* and leads to hypoplastic ovaries from post-natal day (PND) 4 onward [16,22]. A typical feature of neonatal exposure to E2 or xeno-estrogens such as diethylstilbestrol (DES), bisphenol A (BPA) and genistein (GEN) is a high incidence of multi-oocyte follicles (MOFs) in peripubertal mice and rats [18,23–28]. Although these MOFs are thought to arise from reduced oocyte cysts breakdown, oocyte apoptosis and/or basement membrane neosynthesis and deposition, the fine etiology of this morphogenetic abnormality and the role of estrogenic compounds are still obscure.

Increasing concerns of xeno-estrogens impact on health have led to experimental studies using compounds displaying various estrogenic activities (DES, BPA, GEN ...). The use of E2 or estradiol-like molecules with distinct kinetic properties (including ethinyl estradiol, estradiol-benzoate, estradiol-valerate and estradiol-cypionate) as reference molecules has increased the complexity of this issue. Although E2 is widely used as a reference molecule in comparisons with xeno-estrogens, its own mechanism of action is not completely understood. In addition, due to the availability of transgenic mice, many studies addressing the effects of a neonatal exposure to E2 and xeno-estrogens on follicle formation have been carried out using mice. Although the rat has often been the model of choice to study molecules affecting the sexual differentiation of the central nervous system [29,30], the direct effects of neonatal E2 exposure to the ovary remains unclear in this species.

As a consequence, the aim of this study was to better clarify the immediate adverse effects of E2 on the ovary in the rat. To that purpose, we injected newborn pups with E2 during the short time window corresponding to follicle formation. As a prerequisite for an acute evaluation of E2 exposure and in an attempt to define effective doses, we examined dose-effects using doses between 10 µg/day/animal and 0.01 µg/day/animal and compared the dynamics of the resulting plasma E2 in the pups. To gain insights into the fate of E2, we also evaluated dynamics of circulating metabolites and the effects of E2 treatment on the expression of the enzymes of the detoxification machinery in the newborn liver. In the ovary, we searched for detoxification capabilities and evaluated the impact of E2 exposure on: i) these possible local metabolizing capabilities, ii) oocyte survival and iii) follicle formation.

Materials and Methods

Ethical Statement

The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement # C 35-238-19). All the experimental procedures followed ethical principles according to the NIH Guide for Care and Use of the Laboratory Animals and were approved

by the Rennes Animal Experimentation Ethics Committee (#R-2012-CCh-01).

Animal Handling and Treatments

Adult Sprague-Dawley rats were conventionally housed at adequate temperature ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) and humidity (around 55%) with 12:12 h light/dark cycles and free access to food and tap water. Their food contained soy (Special Diets Services, Witham, England). Females were mated overnight with males. The following day was considered to be embryonic day 0 (e0). Pregnant females were isolated three days before birth, which generally occurs at e22.5. Newborn females received a subcutaneous injection of 17β-estradiol or corn oil (vehicle-negative control) (Sigma Aldrich) within a few hours after birth (PND0) and on two subsequent days (PND1 and 2). Animals were divided in five groups: one group received the negative control and four experimental groups received 0.01, 0.1, 1 or 10 µg/day of 17β-estradiol.

Organs and Plasma Collection

Animals were killed by decapitation in the morning of PND0, 1, 2, 3 or 6. Trunk blood was collected into heparinized tubes and centrifuged, and plasma was kept frozen (-20°C) until steroid hormone assay. Ovaries were collected at each age, separated from the ovarian capsule and fixed overnight in Bouin's solution for immunohistochemistry or in 2% paraformaldehyde-PBS (pH 7.2) for 1 h at 4°C for *in situ* hybridization. Livers and ovaries were removed and snap frozen for RNA extraction.

Hormone Measurements

Serum samples from two or three animals were pooled and randomized before assaying. Estrone (E1), estradiol (E2), estrone-sulfate (E1-S) and estradiol-sulfate (E2-S) were assayed in two steps using mass spectrometry coupled with gas chromatography [31,32]. Sera were overloaded with deuterated steroid internal standards (CDN isotopes Inc., Canada) and extracted with 1-chlorobutane. The organic extracts were purified on conditioned LC-Si SPE columns (Varian, Les Ulis, France). E1 and E2 were derivatized with pentafluorobenzoyl chloride (103772-1G, Aldrich, Steinheim, Germany). The final extracts were reconstituted in isooctane and transferred into conical vials for injection into the GC system (6890N, Agilent Technologies, Massy, France) using 50% phenylmethylpolysiloxane VF-17MS capillary columns (20 m×0.15 mm, internal diameter, 0.15 µm film thickness) (Varian, Les Ulis, France). An HP5973 (Agilent Technologies, Massy, France) quadrupole mass spectrometer equipped with a chemical ionization source and operating in single ion monitoring (SIM) mode was used for detection. E1-S and E2-S retained in the aqueous phase of the extraction were measured after acid solvolysis as E1 and E2, respectively [33]. Accuracy, target ions, corresponding deuterated internal control, range of detection, low limit of quantification (LLOQ), and intra & inter assay CVs of the quality control serums are reported in table S1.

In situ Hybridization and Coupled Immunofluorescence

Fixed ovaries were cryoprotected in 20% (wt/vol) sucrose in PBS for 1 h, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles, Inc., Elkhart, IN), cut into 8 µm-thick sections, mounted onto 3-aminopropyltriethoxysilane-treated glass slides (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) and stored at -20°C . The cDNAs used for synthesis of the different riboprobes were obtained by RT-PCR and subcloned into pGEMT_{easy} (Promega). The nucleotide sequences were verified by sequencing. Primers and product

lengths are given in Table 1. Riboprobes were generated by transcription with digoxigenin-labeled deoxy-UTP and the appropriate SP6 or T7 RNA polymerase (Roche). *In situ* hybridization on frozen sections was carried out as previously described [5]. Detection of apoptotic cells was performed on sections previously treated for Ybx2 *in situ* hybridization using the *in situ* cell death detection kit, Fluorescein (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxy-uridine 5'-triphosphate-fluorescein nick end labeling (TUNEL), Roche). After PBS washing, sections were incubated with the TUNEL reaction mixture containing terminal transferase for 1 h at 37°C. For double labeling of sections (if appropriate after detection of Ybx2 or Gper mRNA by *in situ* hybridization), sections were rinsed in PBS and incubated overnight at 4°C with Esr2 (Biogenex, AR385-5R, RTU), fibronectin (Sigma Aldrich, F3648, 1:100) or Ybx2 (Santa Cruz Biotechnologies, Inc. Santa Cruz, CA, sc-21316, 1:200) antibodies. An antigen retrieval procedure was necessary before Esr2 antibody incubation (10 mM citrate buffer, pH 6, at 80°C for 45 min). After washing, sections were incubated with secondary 488- or 594-Alexa anti-rabbit (Esr2, fibronectin) or anti-goat (Ybx2) antibodies (IgG Alexa antibodies, Invitrogen, 1:500). The second primary antibody was incubated overnight with the sections at 4°C, and the second antigen/antibody complex was then reacted with the appropriate secondary antibody. For TUNEL associated with fibronectin detection, the TUNEL reaction was performed as described and followed by fibronectin labeling. Fluorochrome-labeled sections were mounted in Vectashield® containing the DNA stain DAPI (Vector Laboratories), and analyzed with a Zeiss Axio Imager M1 fluorescence microscope connected to a digital camera (Carl Zeiss New York, NY).

Stereological Counts

For oocyte counts, PND0, 1, 2 and 3 ovaries were fixed with Bouin's solution, dehydrated and paraffin embedded according to standard procedures. One out of every five 5 µm sections were mounted with albumin on TESPA-treated glass slides. After dewaxing and rehydration, an antigen retrieval procedure was performed with citrate buffer 10 mM pH 6 at 80°C for 45 min. Unspecific sites were saturated with 10% Bovine Serum Albumin (BSA)-PBS and the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (Gena, clone TRA98, Clinisciences, 1:100 diluted in Dako antibody diluent). After washes in PBS, sections were reacted with a biotinylated secondary antibody (Sigma Aldrich; 1:500 in PBS) and incubated for 4h at room temperature. An avidin-biotin complex linked to a peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs) was used to bind to diaminobenzidine, a peroxidase substrate (Sigma Aldrich). Sections were counter-stained with Masson's Hemalun, dehydrated and mounted in Eukitt (Kindler GmbH). For total oocyte counts, Gena/TRA98-positive cells were counted by using the Computer-Assisted Stereology Toolbox (CAST) Grid System (Olympus, Copenhagen, Denmark) on a light microscope (Olympus BX S1). At first, we delineated the ovarian borders at low magnification. The ovarian volume was deducted by multiplying the sum of the surfaces of each section by the thickness of the sections (5 µm) and another time by 5 because measurement was done every fifth sections. Then, we counted the immunopositive cells using the oocyte nucleus as a marker at 100X using a high-numerical-aperture objective lens on each section. All oocytes were added together to reflect an estimation of the total oocyte number per ovary. For dying oocyte counts, apoptotic cells were detected by the TUNEL technique using the Apoptag cell kit (Millipore, S1700) according to manufacturer's instructions. TUNEL-positive oocytes were

counted in every fifth section and added together to give the total apoptotic oocytes per ovary. Stained sections were examined under a light microscope (Olympus BX51).

RNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA extractions from ovaries and livers were carried out with a Nucleospin XS kit (Macherey Nagel; 740902) according to manufacturer's instructions. Total RNAs (250 ng) were reverse transcribed with random primers and Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen). Conventional PCR was performed using Taq polymerase (Qiagen) in a Peltier thermocycler (MJ Research, Bio-Rad DNA engine) using the primers listed in Table 1. PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 (or 42 in the case of Sult1e1) cycles of 94°C for 30 s, 1 min of annealing, 72°C for 30 s and a 10 min 72°C final extension. Quantitative PCR was performed using the GoTaq® Master mix (Promega) according to manufacturer's instructions with 0.5 µl cDNA template in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. The following amplification program was used: a 2 min holding stage at 50°C, initial denaturation of 10 min at 95°C, 40 cycles of 1 sec amplification at 95°C and 1 min at 60°C for annealing and extension. Dissociation curves were produced using a thermal melting profile performed after the last PCR cycle. To avoid amplification of contaminating genomic DNA, primer pairs were selected on either side of an intron. Snx17 mRNA was used as an internal control for normalization. Results were expressed by $\Delta\Delta CT$ method as *n*-fold differences in target gene expression, relative to the reference gene and calibrator sample which is constituted of an equal mixture of all the samples tested specifically in each tested organ.

Data Analysis

Microarray data analysis was carried out on datasets from Kezele *et al.*, [34], GSE 9300 (GSM237013-237016) using the Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) analysis software [35]. GeneChip data were normalized using the Robust Multi-Array Average (RMA) method and the resulting expression values for ovary replicates at PND0 and PND4 were averaged. Probe sets yielding a signal higher than the detection threshold (median of the normalized dataset, cutoff 7.47), and a fold-change ≥ 1.5 between PND0 and PND4 averaged ovary samples, were selected. A Linear Model for Microarray Data (LIMMA) statistical test (F-value adjusted with the False Discovery Rate method: $p \leq 0.05$) was used to identify probe sets with significantly different expression. For further classification, we divided the selected probe sets into groups being significantly decreased or increased in PND4 ovary samples as compared to PND0. We restricted our subsequent analysis to probe sets corresponding to genes associated with the "steroid metabolic process" Gene Ontology annotation term (GO:0008202).

Statistical Analysis

Quantitative PCR data and cell counts are presented as mean \pm SEM. Blood and ovaries for quantitative PCR from different animals were pooled to form one sample and several pools from different litters were used for a given treatment and time point. The sizes of the pools are given in each figure legend. For oocyte counts, 4–13 ovaries were used, as specified for each parameter in the corresponding figure legend. An analysis of the variance (one-way or two-ways ANOVA) followed by the appropriate post-hoc test was used to compare differences between groups, as specified in each figure legend. Significance was accepted at a confidence level of $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using the

Table 1. Primers used for qPCR and *in situ* hybridization (*).

Gene	Upstream primer	Downstream primer	Product length (bp)	Annealing T°C
Bax	CTAGCAAACTGGTGCTCAAGG	GGAGGAAGTCCAGTGCCAG	84	60
Bcl2	AACATCGCTCTGTGGATGACT	ACAGCCAGGAGAAATCAAACA	133	60
Cyp1b1	GCAGCCGCTTCTGGTAGC	CCACGCGCCCTGTCCCTACT	116	60
Cyp2b1/2	ATGTTTGGTGGAGGAAGTGC	CTGGCGGTCTGTGTAGTCAA	130	63
Eif4e	AGCAATATGGACGACTGAATGTGA	TGTCTGCGTGGGACTGATAACC	119	60
Esr1	GATCAAGTTCACCTTCTGGA	AGCAAGTTAGGAGCAAACAG	107	60
Esr1 *	CTACAGGTCCAATTCTGACA	TGGAGACATGTAGTCATTATG	220	58
Esr2	GAAGCTGAACCAATGT	CAGTCCCACCATAGCACCT	210	60
Esr2 *	ACGGTGGGATGCACCCC	GCCAATCATGTGCACCAG	201	58
Figla	ATGGACACGTCGTCGCTGC	TGGCCACCATACGCCCAAGG	524	60
Foxa3	ATGCTGGGCTCAGTGAAGAT	GGGAGAGCTAAGAGGGTTCAA	147	60
Gper	TCTACCTAGGTCCCGTGTGG	AAGCTCATCCAGGTGAGGAA	418	60
Gper *	TCTACCTAGGTCCCGTGTGG	AAGCTCATCCAGGTGAGGAA	418	58
Gsta2	GGCAAAGACAGGACCAAAA	GGCTGCAGGAATCTTTCAC	231	62
Gstm5	GGTTTGCAGGAGAAAAGCTG	TGATTGGCATCTTGAAGCAG	186	62
Gstp1	GGGCATCTGAAACCTTTTGA	GAGCCACATAGGCAGAGAGC	175	63
Hnrnpk	TGCTGATGAAACTTGGGACTCTG	CGAATTTGTTTAATCCGCTGACC	222	60
Hsd17b2	GACAAAGGACTGTGGGCTGT	AACACCTTGGTGACCTCGAC	137	60
Nobox	GAAGACATGGGACCTCAGGA	GCCGAAAGGAAATGAAAACA	192	60
Nr1i2	GACGGCAGCATCTGGAACCTAC	TGATGACGCCCTTGAACATG	112	60
Rbp4	GGACGAGTCCGCTTCTGAG	AAAGGAGGCTACACCCCACT	114	60
Scp1	AGCTTTTGGGAGAGGTTGAGAA	TCAGCTATTTTATGTTGGCATCGT	97	62
Snx17	CCTCTACCCAAGAGGAGATTATACAA	CCAAGAGGGAACAGAACAACT	100	60
Sult1e1	GTGGAAAAATGCAAGGAGGA	GCTTAGCTGGCAGGTGAGTT	139	58
Ugt1a1	ACACCGGAAGTACCATCTG	TTGGAACCCATTGCATATT	153	62
Ybx2 *	CACCTCCCTTCTCTATCGA	GGTGATGCCTCTGAACAATA	637	58

doi:10.1371/journal.pone.0082175.t001

SigmaStat 2.0 software package (Systat Software Inc, San Jose, CA).

Results

Response of the Whole Organism to E2 Exposure

Besides its biological activity involving by binding to receptors and subsequent transcriptomic activity, E2 is transformed into several possible metabolites before excretion (Fig. 1A). To monitor the dynamics of plasma E2 levels after E2 treatment in comparison to physiological levels, we measured E2 levels in rat neonates at PND0 (before injections) and 16 h after each injection on days PND1 to PND3 and PND6 (Fig. 1B). The mean E2 levels significantly decreased after birth in control females and drastically dropped at PND6. All treated groups followed the same trend, except the 0.01 µg group which did not differ from controls. E2 plasma levels increased at PND1 following the first injection of E2 (statistically significant in only the 10 µg/d-treated group), but significantly decreased until PND3 in spite of repeated injections. Plasma E2 levels of the 10 µg/d-treated group did not return to baseline at PND3 but were the same as control levels from PND6 onwards.

To explore the fate of E2 in the females, we quantified the presence of several major E2 metabolites (estradiol-sulfate (E2-S), estrone (E1), and estrone-sulfate (E1-S)), at the same time points (Fig. 1B–E). Estriol (E3), another natural E2 metabolite, was also

assayed but all the samples displayed concentrations below the detection limit (10 pg/ml). In contrast to E2, E2-S remained constant in all samples, irrespective of the huge raise in E2 levels in the 10 µg/d group (Fig. 1C). Time, but not treatment, had a significant effect on E2-S level ($P < 0.001$). E1 profiles were highly similar to those of E2 in accordance with the injected dose (Fig. 1D). The higher E1 levels at PND1 were statistically significant in the 10 µg/d and 1 µg/d groups. Similar to E2, E1 levels dramatically dropped at PND6 with time and treatment having independent effects. E1-S peaked at PND3, and this increase was significant in the 10 µg/d and 1 µg/d groups. In all groups, plasma E1-S levels decreased between PND3 to PND6 (Fig. 1E). The two-way analysis of variance revealed that the variation of all metabolite levels was statistically correlated with time, independently of treatment. The dose of injected E2 significantly affected the mean values of all metabolites except E2-S. The multiple comparison procedure identified the E2 10 µg/d group as different.

The increase in E1 levels after E2 injections suggested a metabolic conversion between those two forms. We therefore investigated variation in the expression of *Hsd17b2*, and of several phase-I and phase-II enzymes involved in hepatic detoxification of estrogens (*Ugt1a1*, *Cyp1b1*, *Cyp2b1/2* and *Gsta2*), in response to 10 µg/d E2 by quantitative PCR in the liver (Fig. 1F–J). mRNA levels of *Hsd17b2* and *Cyp2b1/2* increased from PND0 to PND1 in the control group but there was no variation in the E2-treated

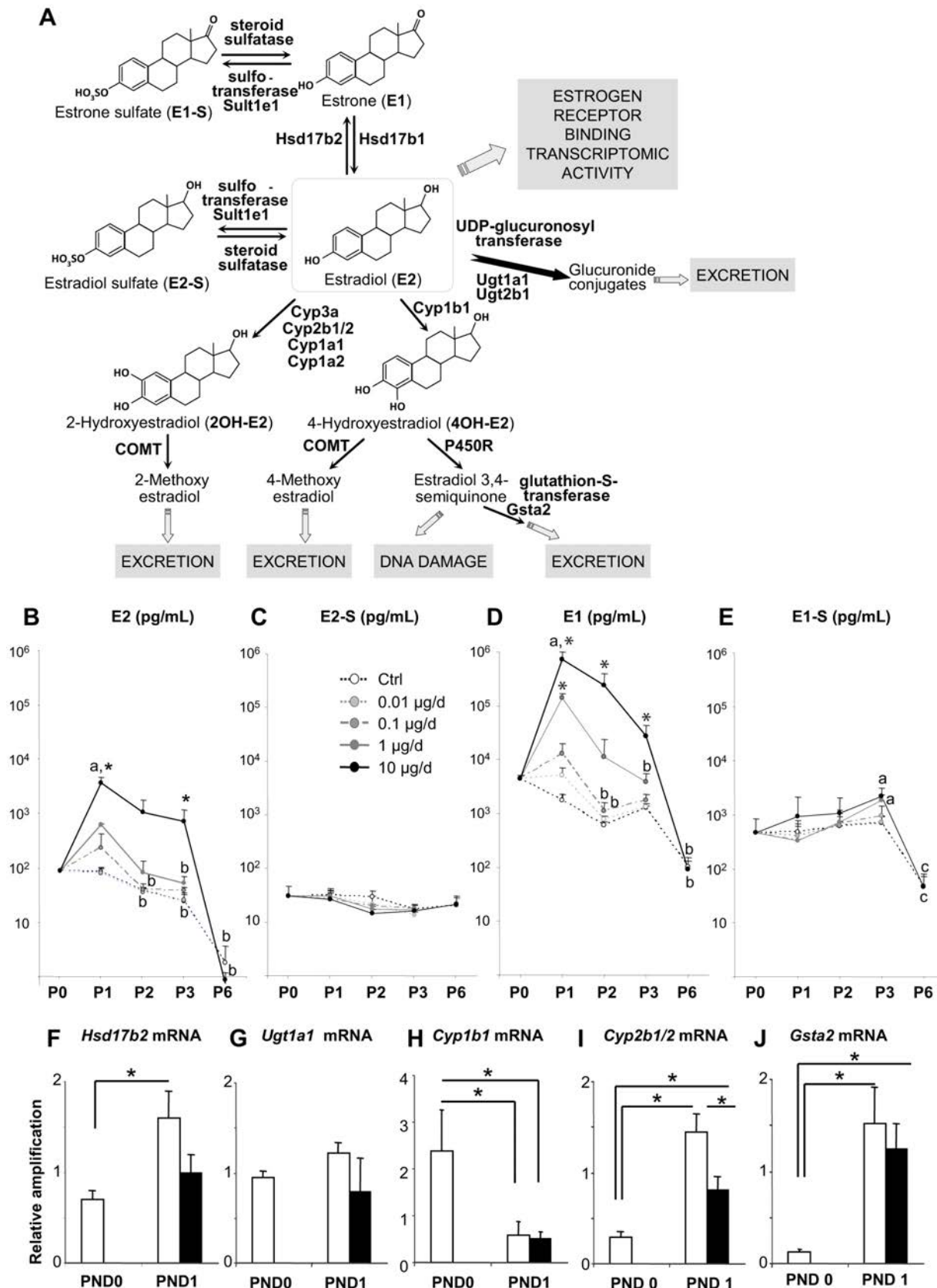


Figure 1. Plasma and hepatic reaction to acute estrogen exposure. A. Representative scheme of E2 biological activity and detoxification pathways. E2 can go through oxidative metabolism and be converted in E1 by 17 β Hsd2 or in hydroxyl-metabolites by enzymes of the Cyp family. Then it can be methylated by COMT, reduced by P450 reductase (resulting in DNA damage) or excreted after conjugative metabolism by GST. E2 can

also be directly sulfo-conjugated by SULT or gluco-conjugated by UGT, and excreted. B–E. Plasma estradiol (B) and derivatives E2-sulfate (E2-S; C), estrone (D) and estrone-sulfate (E1-S; E) were measured by GC/MS from the day of birth (P0) to PND6 (P6). Each point represents the mean \pm SEM of at least four pools of two animals each. A two-way ANOVA indicated that there was a significantly different profile for the 10 μ g/d E2 treatment than for all other treated or control groups ($p < 0.001$), E1 ($p < 0.001$), E1-S ($p = 0.002$). Hormonal levels varied according to time, independent of treatment, for each metabolite tested: E1 ($p < 0.001$), E2 ($p < 0.001$), E1-S ($p < 0.001$) and E2-S ($p < 0.001$) ($n = 4$ –5 pools of 3 to 4 animals at PND0, 4–5 pools of 2–4 animals at PND1, 4 pools of 2–3 animals at PND2, 4 pools of 2 animals at PND3 and 8 animals at PND6). F–J. Quantitative RT-PCR for *Hsd17b2* (F), *Ugt1a1* (G), *Cyp1b1* (H), *Cyp2b1/2* (I) and *Gsta2* (J) using liver samples of controls (white bars) and animals treated with 10 μ g E2 at PND0 and PND1 (black bars) shows E2 impairment on post-natal *Hsd17b2*, *Cyp2b1/2* and *Gsta2* expression dynamics. Each bar represents mean \pm SEM of the fold-change in target gene expression relative to a reference gene *Srx17* and calibrator sample. Each point represents mRNA from 3 pools of ovaries from 3 animals. * $p < 0.05$ (two-way ANOVA, followed by Tukey test). **a** shows an increase from PND0, **b** shows a decrease from PND1, **c** shows a decrease from PND3 and * shows a difference from the age-matched control group. doi:10.1371/journal.pone.0082175.g001

group (Fig. 1F, I). *Ugt1a1* levels did not vary significantly with age or treatment (Fig. 1G). The levels of *Cyp1b1* mRNA (Fig. 1H) were lower at PND1 than at PND0 and treatment had no effect. In contrast, the levels of *Gsta2* mRNA were higher at PND1 than at PND0 in 10 μ g/d-treated and control animals (Fig. 1J).

Ovarian Estrogen Receptivity in Response to E2 Exposure

Regulation of expression of the well known-nuclear estrogen receptors, *i.e.* *Esr1*, *Esr2*, of the membranous estrogen receptor *Gper* and of the nuclear receptor *Nr1i2*, which can bind estrogens and whose expression is regulated at birth in mouse ovary [36,37] was assessed around the time of treatment by quantitative PCR (Fig. 2A–D). The expression of *Esr1* mRNA significantly decreased between e18.5 and PND12 (Fig. 2A), while expression of *Esr2* mRNA was low at e18.5 and significantly increased from birth to PND12 (Fig. 2B). *Gper* and *Nr1i2* mRNA had similar age-associated expression profiles (Fig. 2C–D).

We investigated which ovarian cell types expressed estrogen receptors around the time of treatment and in later development in ovarian sections using *in situ* hybridization (Fig. 2 E–P, M) and immunofluorescence (Fig. 2 M–O). From PND1 on, we observed a strong *Esr1* mRNA signal in the epithelium of the differentiating oviduct (Ovd in Fig. 2E) and a close-to background signal in the ovary (Fig. 2E, H and Figure S1). *Esr2* mRNA was expressed in the epithelium of the differentiating oviduct as well as in the ovary (Fig. 2F) and its expression increased in granulosa cells with follicle growth at PND6 (Fig. 2 F, I and K). *Gper* mRNA expression pattern was very similar to that of *Esr2* (Fig. 2 G, J and L). The comparison of *Gper* mRNA and *Esr2* protein labeling with the oocyte marker *Ybx2* showed that oocytes expressed both receptors (Fig. 2 L–O). These data suggest that some *Esr1*, and to a greater extent *Esr2* and *Gper*, were expressed in the oocytes and (pre-)granulosa cells at the time of estrogen injections.

Since estrogen receptors themselves have been described as direct target of estrogens, we measured the profile of expression of their transcripts in response to a 10 μ g–E2 exposure (Fig. 2 N–Q). Quantitative PCR at PND0, between 2 and 4 h after injection, and at PND1 was carried out to investigate the early transcriptomic response of the ovary. *Esr1* had a stable expression between PND0 and PND1 and treatment did not affect its expression (Fig. 2N). Similarly, *Esr2* had a stable expression in the control group between PND0 and PND1 and, although E2 treatment tended to increase the expression between PND0 and PND1, this did not reach statistical significance (Fig. 2O). Expression levels of *Gper* significantly increased between PND0 and PND1 in the control group but remained unchanged in the E2-treated group (Fig. 2P). A similar post-natal increase in *Nr1i2* mRNA expression was found in control ovaries but not observed in E2-treated ovaries (Fig. 2Q).

Modifications of Ovarian Metabolic Capabilities in Response to E2

To get insights into the expression of enzymes of the E2 metabolic pathway in the post-natal ovary, we explored already published transcriptomic profiles of PND0 compared to PND4 rat ovaries [34]. We restricted our analysis to the 227 probe sets (transcripts) associated with the GO term annotation “steroid metabolic process” (GO:0008202). Out of the 133 probe sets with detectable intensity signals in either PND0 or PND4, 114 transcripts did not display differential expression. However, we found 12 to be associated with a significantly increased expression pattern from PND0 to PND 4, and four to be associated with a significantly reduced expression pattern (Fig. 3A). Enzymes involved in E2 biosynthesis increased after birth (statistically significant differences in mRNA expression for *Star* and *Hsd3b1*, but not significant for *Cyp17a1* and *Hsd17b1*). This may well correlate with the very first steps of theca-interstitial tissue differentiation. In contrast, mRNAs encoding enzymes involved in E2 transformation such as *Sult1a1* and, to a lesser extent, *Hsd17b2*, and *Cyp1b1* decreased in prevalence between PND0 and PND4 (Fig. 3A). Because the microarrays used in this study covered approximately half of the known protein-coding genes, data were partial. We thus selected enzymes of each branch of E2 detoxification pathway to compare by quantitative PCR their expression in PND0 and PND1 neonatal and adult ovaries as well as in PND0 livers (Fig. 3B). The mRNA levels of *Hsd17b2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b1/2*, *Gsta2* and *Gstp1* were globally constant over time. By contrast, *Sult1e1*, *Ugt1a1* and *Gstm5* were preferentially expressed in the neonatal ovary and merely absent in the adult organ. Of note, *Ugt1a1* and *Gstm5* were preferentially expressed in the ovary while *Cyp2b1/2* was preferentially expressed in the liver, thus highlighting different pathways of detoxification in each organ. Altogether, these results suggest that the ovary possesses the machinery to locally metabolize E2.

We used quantitative PCR to investigate variation in the expression of selected estrogen metabolism enzymes in response to E2 exposure (Fig. 3 C–F). The expression of *Hsd17b2* was similar in the control and treated groups at PND0. Whereas it remained constant at PND1 in the control group, E2 treatment induced a significant increase in expression in the treated group (Fig. 3C). *Cyp1b1* mRNA levels did not vary 2 h after the E2 injection (Fig. 3D). However, whereas *Cyp1b1* mRNA levels increased significantly between PND0 and PND1 in the control group, they remained unchanged in the treated group (Fig. 3D). The expression of *Cyp2b1/2*, which was slightly greater in the control group than in the treated group at PND0, dramatically increased between PND0 and PND1 in control group but did not significantly change in the E2-treated group (Fig. 3E). Expression of *Gsta2* did not vary in the control group, but significantly increased in the treated group between PND0 and PND1 (Fig. 3F). *Ugt1a1* mRNA profile was not modified with either time or treatment (Fig. 3G). *Rbp4*, which has previously been shown to be

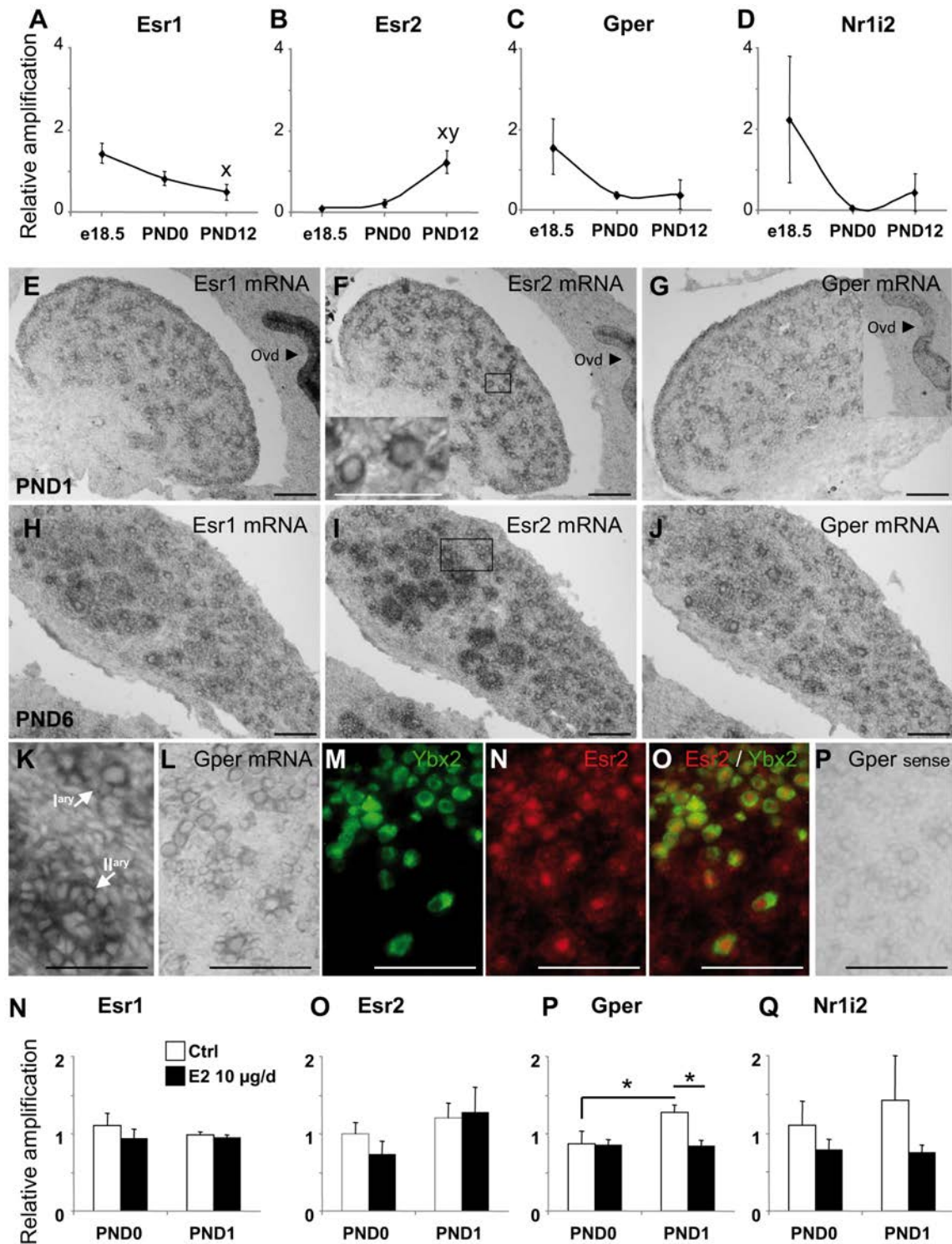


Figure 2. Perinatal ovarian receptivity to estrogens. A–D: Quantitative RT-PCR for *Esr1* (A), *Esr2* (B), *Gper* (C) and *Nr1i2* (D) performed on control ovaries at e18.5, day of birth (PND0) and PND12. Each point is constituted by three pools of at least four animals. Data points represent the mean \pm SEM of the fold-change in target gene expression relative to a *Snx17* reference gene and calibrator sample. Each point represents mRNA from 3 pools of ovaries from 3 animals. * $p < 0.05$ (ANOVA, followed by PLSD test). **x** shows a statistically significant difference from e18.5 and **y** shows a statistically significant difference from PND0. E–P: *In situ* hybridizations for *Esr1* (E, H), *Esr2* (F, I, K), and *Gper* (G, J, L) in PND1 (E–G) and PND2 (L–P) control ovaries show lower *Esr1* expression in the ovary than in the oviduct epithelium (Ovd), higher expression of *Esr2* in granulosa cells with follicle growth, and expression of *Gper* in the oocytes and granulosa cells. Inset in F shows a higher magnification of a group of follicles boxed in F. K shows a higher magnification of a primary (Iary) and a secondary (IIary) follicles boxed in I. Inset in G shows another section of the ovary containing the oviduct. A comparison of *Gper* mRNA profile by *in situ* hybridization (L) with *Esr2* (N, red) and *Ybx2* (M, cytoplasmic, green) (and merged pictures O) by immunofluorescence revealed co-expression of both receptors in oocytes at the time of treatment. P shows hybridization with *Gper* sense probe. Scale bar: 100 μ m except in inset in F and K (50 μ m). Q–T: Quantitative RT-PCR for *Esr1* (Q), *Esr2* (R), *Gper* (S) and *Nr1i2* (T) using

ovarian samples of controls (white bars) and animals treated with 10 μg E2 at PND0 (2 h after injection) and PND1 (black bars) shows E2 impairment of post-natal *Gper* up-regulation. Each bar represents mean \pm SEM of the fold-change in target gene expression relative to a *Snx17* reference gene and calibrator sample. Each point represents mRNAs from 3 to 6 pools of 6–16 and 10–26 ovaries, respectively. * $p < 0.05$ (ANOVA, followed by PLSD test).

doi:10.1371/journal.pone.0082175.g002

a target of E2 in the fetal and juvenile rat ovaries [38], followed the same trend as *Cyp11b1* and *Cyp2b1/2*, albeit not significantly (Fig. 3H).

Estrogen Dose-dependent Depletion of Oocyte Pool

Repeated 10 μg E2 treatment is known to effect the volume of infantile [22] and pre-pubertal ovaries [39]. Since sections of PND3 ovaries of the 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ group were smallest compared to control ones at the histological level (Fig. 4A–C), we performed stereological measurements of ovarian volumes for each dose group (10, 1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{d}$) after the end of the treatment at PND3 (Fig. 4D). Ovarian volume followed a dose-dependent decrease after E2 treatment but this was only statistically significant for the 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ dose (Fig. 4D). Because this modification was rapid, we chose to evaluate the total number of oocytes instead of categorizing naked/primordial/primary follicles by morphological criteria using oocyte nucleus labeling with GENA [40] (Fig. 4E). Oocyte population decreased as a function of the dose of injected E2: at doses of 1 $\mu\text{g}/\text{d}$ and above, the population size was significantly different to that of control individuals. These data suggested that neonatal E2 supplementation depletes the oocyte pool in female rats. We used the 10 μg dose for further investigations as this dose had effective effects on both ovarian volume and oocyte number.

We analyzed the time-course of oocyte depletion after a 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 treatment (Fig. 5A). Oocyte numbers decreased with a similar slope between PND0 and PND2 in control and treated groups and oocyte depletion extended for one more day in E2-treated females (Fig. 5A). Since oocyte apoptosis is a physiological process that characterizes follicle formation [12,14], we quantified apoptotic oocytes after TUNEL assays between PND0 and PND2 in control and E2-treated females (Fig. 5B). Both groups of females displayed a similar post-natal decline in apoptotic oocyte number from PND0 to PND2 and we could not detect any difference between control and treated ovaries (Fig. 5B). In agreement, the mRNA levels of the pro-apoptotic *Bax* gene (measured by quantitative PCR) were stable in both control and treated ovaries between PND0 and PND2 (Fig. 5C). By contrast, the mRNA levels of the anti-apoptotic *Bcl2* gene were steady stable in control ovaries while lower to control ones 4 h after the first injection and then increasing in E2-treated ovaries (Fig. 5D).

We investigated the expression of genes proposed to be involved in follicle formation (*Fgla*, *Hnmpk*, *Foxo3a* and *Nobox*) and meiosis progression (*Eif4e*, *Scp1*) [41–47]. To detect early changes triggered by the E2 treatment, quantitative PCR were performed before a decrease in oocyte number was detected (at PND0, PND1 and PND2). E2 treatment only affected the profile of *Nobox* expression at PND2 (Fig. 5E–J): *Nobox* mRNA expression increased between PND1 and PND2 in control ovaries but not in E2-treated ones. This suggested that, apart from *Nobox*, genes classically involved in follicle formation may not have a role in E2-induced oocyte depletion.

Abnormalities of Follicle Formation in Response to E2 Exposure

The wave of physiological oocyte programmed cell death progresses from core areas to the periphery of the ovary in rodents [48]. Degenerating oocytes are located in areas of new basement

membrane deposition which delineate the emerging follicular units [11]. We investigated the topographical pattern of oocyte degeneration by comparing TUNEL-positive cells and fibronectin-labeled extra-cellular matrix at PND1 (Fig. 6A–D). Whereas typical apoptotic oocytes were found close to basal membrane remodeling in both control and E2-treated ovaries, numerous degenerating oocytes, already enclosed in follicles, were observed in the core of the E2-treated ovaries (Fig. 6D).

Because MOFs are a hallmark of neonatal estrogenization, we investigated cord fragmentation by analyzing fibronectin-labeled basal membrane deposition around newly formed follicular units (Fig. 6E–H). Ovarian cord fragmentation was nearly complete in control animals at PND3 (Fig. 6E) but follicle formation anomalies, such as epithelial structures devoid of oocyte and incomplete cord fragmentation, were observed in 10 μg -treated animals (Fig. 6F). At PND6, an age at which follicle formation is known to be completed (Fig. 6G), many abnormalities (such as follicular units devoid of oocytes) remained in E2-treated ovaries (Fig. 6H).

Discussion

Our results provide direct evidence that the newborn female rat rapidly acquires the capability to partially protect itself against repeated E2 injections by decreasing E2 in the plasma. This is associated with a change in the expression profiles of several hepatic detoxification enzymes involved in its own metabolism. Interestingly, the ovary itself expresses enzymes for E2 metabolism and modifies their expression in response to E2. We show that neonatal E2 exposure can directly affect oocyte survival in a dose-dependent manner in the rat. Oocyte depletion is time-dependent for the highest dose tested and affects already formed follicles in addition to areas of ovarian cord remodeling. The data highlights a dramatic species difference as experimentally-increased E2 levels promote oocyte survival in the mouse.

Whole Organism Response to E2

In our control female pups, E2 levels decreased from 90+/-3 pg/mL at PND0 to 24+/-11 pg/mL at PND3 and fell to 2+/-2 pg/mL at PND6. The 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ doses raised the levels up to 80+/-17, 233+/-199, 618+/-34 and 3685+/-968 pg/mL at PND1, respectively. By comparison, mean E2 levels in ovarian venous blood during pregnancy have been described to plateau at levels between 120+/-19 to 199+/-55 pg/mL between e3 and e17, which are close to estrus levels (161+/-28 pg/mL), then raise up to 445+/-115 pg/mL at e21, 348+/-74 at e22, and peak at 628+/-210 pg/mL at parturition [49]. Studies on xeno-estrogen effects on the ovary and hypothalamus classically use a 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 dose as a positive control [22,27,50–54]. By comparing the dynamics of E2 plasma levels in controls and animals treated with different doses of E2, we showed that doses from 0.1 $\mu\text{g}/\text{d}$ tend to increase circulating E2 levels above control levels at PND1. This became statistically significant for the 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ dose, which raised circulating levels by up to 15 times that of the physiological levels at PND1. Thereafter, it was not possible to maintain PND0 E2 levels by E2 injection with a given dose because plasma E2 levels decreased from PND1 to PND3 despite repeated injections in the different treatment

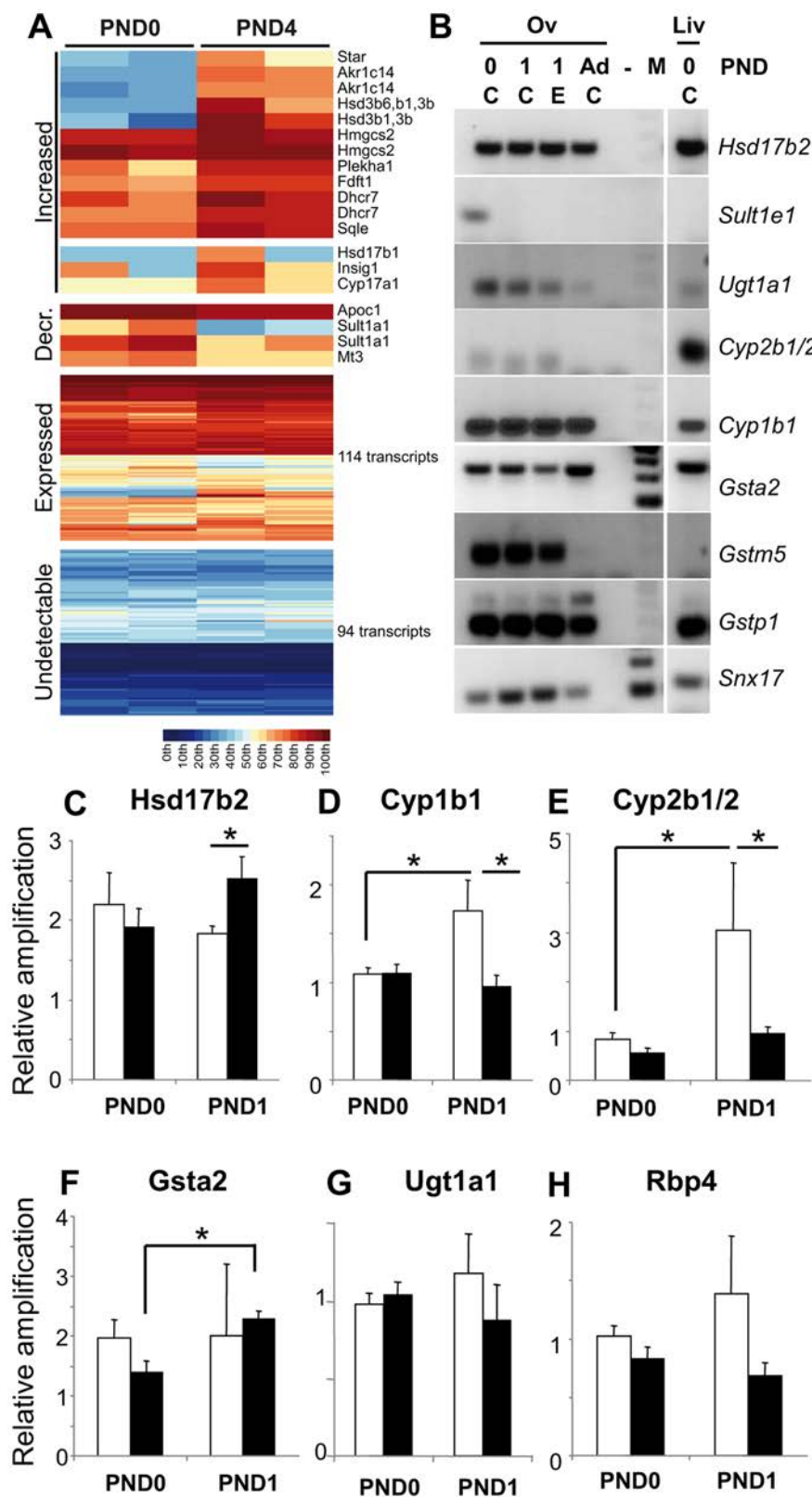


Figure 3. Ovarian reaction to acute estrogen exposure. A. A false-color heatmap shows cases of increasing, decreasing, detectable (but without differential expression) and undetectable transcript signal intensities across the replicates for different total ovary samples at the time points given (top). Each line corresponds to a probe set and each column to a sample replicate. A color scale is shown for signal intensity percentiles (bottom). Gene symbols and numbers of transcripts are shown at the right. B. Conventional RT-PCR screening of the expression of various enzymes involved in E2 metabolism in PND0, control (C) and E2-treated (E) PND1 and adult female ovaries, and PND0 livers reveals changes in expression of *Ugt1a1*, *Gsta2*, *Gstm5* between newborn and adult ovaries, stable expression of *Hsd17b2*, *Cyp1b1*, *Gstp1*, and the faint expression of *Sult1e1* and

Cyp2b1/2 by contrast to control *Snx17* RNAs. C–H. Quantitative RT-PCR for *Hsd17b2* (C), *Cyp1b1* (D), *Cyp2b1/2* (E), *Gsta2* (F), *Ugt1a1* (G) and the *Rbp4* E2 target gene (H) in ovaries of controls (white bars) and animals treated with 10 μ g E2 (black bars) at PND0 (2 h after injection) and PND1 shows E2 impairment of post-natal *Gper* up-regulation. Each bar represents mean \pm SEM of the fold-change in target gene expression relative to a *Snx17* reference gene and calibrator sample. Each point represents mRNAs from 3 to 6 pools of 6–16 and 10–26 ovaries, respectively. * $p < 0.05$ (two-way ANOVA, followed by Tukey test).
doi:10.1371/journal.pone.0082175.g003

groups. This indicated that newborns progressively acquire the capability to clear E2 from the organism. A return to levels similar to that of controls was reached at PND6 for all dose groups but not at PND3, *ie* only a few days after termination of the treatment. The only dose where circulating levels were found to be higher than control levels during the whole course of the treatment was 10 μ g/d. Consequently, the effective dose at the systemic level is 10 μ g/d. In addition, although studies on neonatal estrogen exposure use either E2 or esters of E2 that display different half lives in the organism [55], the effective dose is typically 1–10 μ g/d at the hypothalamus level [22,27,50–54]. By addressing dose effects, we show here that a 10 μ g/d is also the effective dose in the ovary.

Altogether, our results on hormone profiling and mRNA quantification after E2 injections suggest that the newborn rat acquires the complex capability to metabolize E2 according to fine dynamics in the days following birth. Estradiol metabolism is carried out by enzymes that convert E2 to a biologically less active estrogen (E1) and by phase-I and II enzymes that catalyze oxidation and conjugations to permit their rapid excretion by the kidney (Fig. 1A). The decrease of circulating E2 in controls suggests that mother-derived E2 is cleared by the newborn, insofar as the newborn itself does not synthesize E2. At birth, the rat ovary is not able to produce E2 [56] until the granulosa cells of the first wave of follicular growth typically express *Cyp19a1*. This typical expression is associated with the peak levels of E2 during the

infantile period [5,6]. By PND2, even after repeated injections of the highest dose, circulating E2 levels decreased concomitantly with a sharp increase of E1. This suggests that newborn females can convert excessive E2 into E1, which is supported by *Hsd17b2* activity. Subsequent conversion of E2 and E1 into hydroxyl-metabolites is handled by typical phase I enzymes of the *Cyp* family, *ie* *Cyp1a2*, *2b1/2*, *2c6*, *2c11* and the *3a* family [57–59]. Phase II estrogen metabolism includes sulfatation, glucuronidation, *O*-methylation and glutathione-conjugation, which are catalyzed by sulfo- (*Sult*), UDP-glucuronosyl- (*Ugt*), catechol-*O*-methyl- (*COMT*) and Glutathion-S-Transferases (*Gst*), respectively. Sulfates and glucuronides are the most abundant circulating estrogen conjugates [60]. While glucuronides are primarily excretion forms, sulfate derivatives have also been described as storage forms [60,61]. The absence of statistical changes in circulating levels of sulfated estrogens, excepted for E1S at PND3, could reflect either the absence of increased sulfatation process (and possibly the absence of regulation of expression and/or activity of enzymes in charge of this process), or an increase of the excretion of sulfate-conjugated estrogens, or both.

We were not able to measure the hydroxyl- and glucuronide-conjugated metabolites of E2 and E1 because of their instability and the low quantity of plasma that can be recovered in each newborn. We therefore investigated hepatic regulation of the mRNA expression of selected relevant enzymes of the E2 metabolic pathway. In agreement with the well-known post-natal

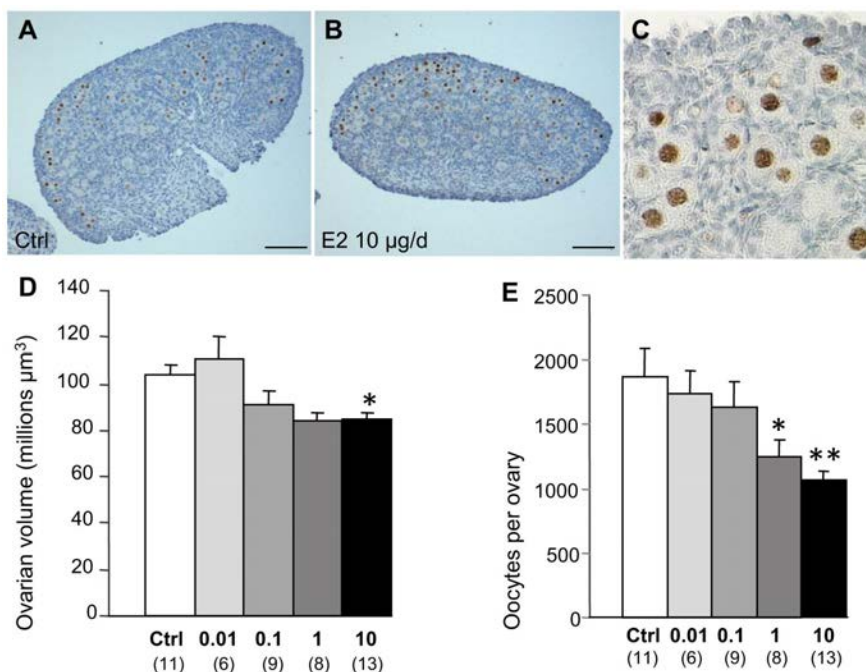


Figure 4. Estrogen dose-dependent depletion of oocytes. A–C. Immunolabeling of TRA98 in oocytes of control animals at PND3 (A) and females treated daily with 10 μ g/d E2 between PND0 and PND2 (B). Higher magnification of TRA98 labeling shows oocyte-specific expression (C). Scale bar = 100 μ m. D–E. Stereological estimation of ovarian volume (D) and oocyte numbers per ovary (E) at PND3 in controls, and as a function of E2 dose, show a dose-dependent decrease of both parameters. Each bar represents means \pm SEM. Number of ovaries are indicated in brackets on the abscissa. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ (ANOVA followed by Fisher test).
doi:10.1371/journal.pone.0082175.g004

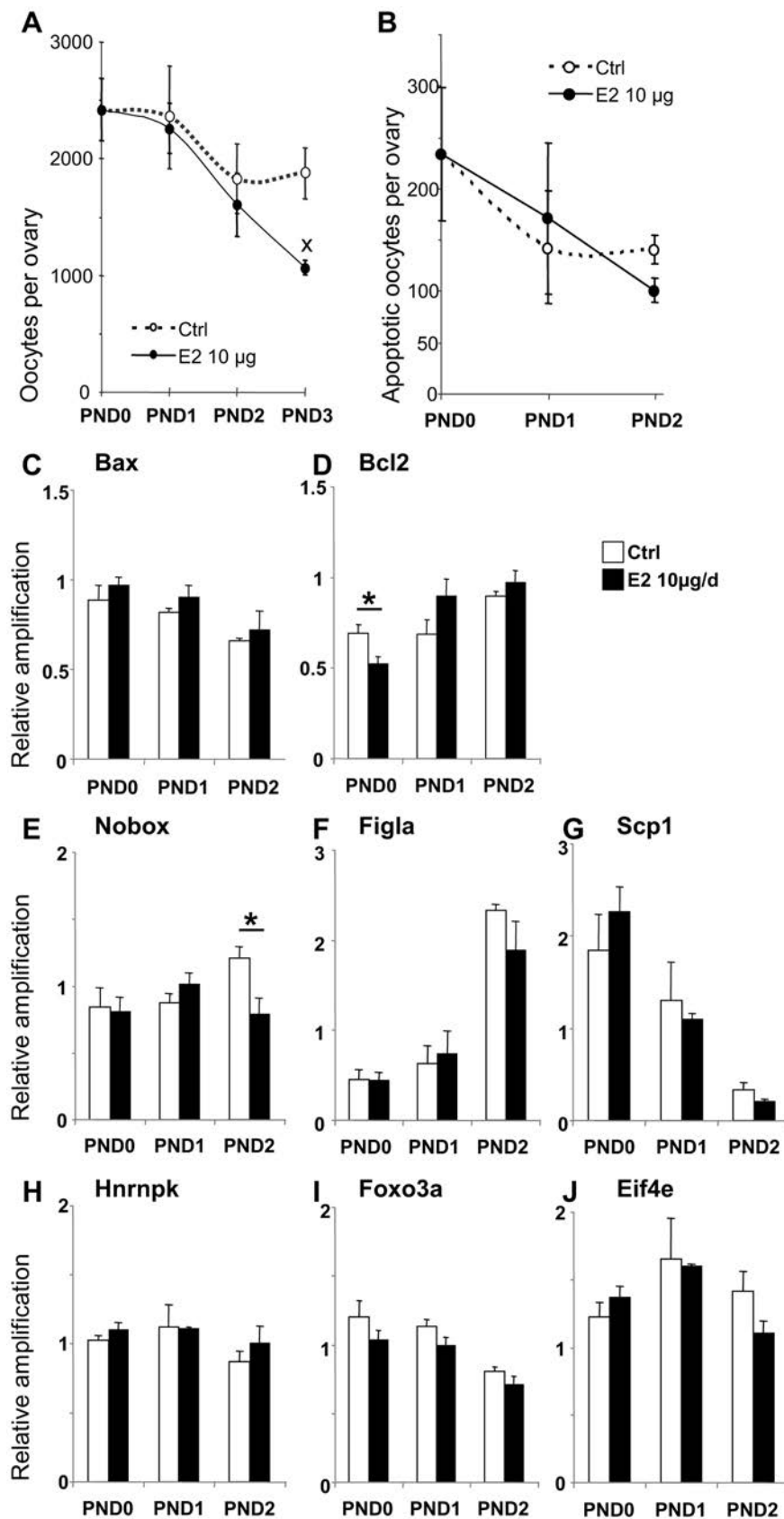


Figure 5. Characterization of oocyte depletion. A. Time-course showing the decline in oocyte number per ovary in control (white points and dotted lines) and 10 µg E2-treated ovaries (black points and continuous lines) from PND0 to PND3. Data are expressed as mean \pm SEM of 5–14 ovaries. * $p < 0.01$ vs. age-matched controls (ANOVA followed by PLSD test). B. Time-course of apoptotic oocyte number per ovary in control (white

points and dotted lines) and 10 μ g E2-treated ovaries (black points and continuous lines) from PND0 to PND2. Data are expressed as mean \pm SEM of 4–8 ovaries. C–D. Quantitative RT-PCR for *Bax* (C), *Bcl2* (D), *Nobox* (E), *Figla* (F), *Scp1* (G), *Hnrnpk* (H), *Foxo3a* (I) and *Eif4e* (J) in ovarian samples of controls (white bars) and animals treated with 10 μ g E2 (black bars) at PND0 (2 h after injection) and PND1 shows transient down-regulation of *Bcl2* mRNA at PND0 and the absence of *Nobox* mRNA up-regulation between PND1 and PND2 in E2-treated ovaries. Each bar represents mean \pm SEM of the fold-change in target gene expression relative to a *Srx17* reference gene and calibrator sample). Data from 3–6 pools of 6–14 ovaries. * $p < 0.05$ vs. age-matched control (two-way ANOVA, followed by t-test). doi:10.1371/journal.pone.0082175.g005

maturation of the hepatic endowment of enzymes of lipid metabolism [7,62,63], we found up-regulation of *Hsd17b2*, *Cyp2b1/2* and *Gsta2* and down-regulation of *Cyp1b1* mRNA levels between PND0 and 1. In contrast, transcripts encoding *Ugt1a1* (which contribute to glucuronide conjugation together with *Ugt1a3*, *1a8*, *1a9*, *1a10* and *2b7* [64,65,66]), were not modified between PND0 and PND1. Despite its major protecting role against E2 effects in male tissues, and the clear reproductive phenotype in females lacking its expression [67,68], it was not possible to investigate *Sult1e1* regulation of expression as it was expressed at levels below the qPCR threshold.

Our mRNA quantifications in the liver suggest that E2 itself, at least at the highest dose, inhibited the physiological up-regulation of hepatic *Hsd17b2* and *Cyp2b1/2* mRNA, which encode two key enzymes of the E2 detoxification pathway. This could indicate that the level of enzymes in the newborn liver is sufficient for E2 conversion. Alternatively, E2 treatment could counter the physiological acquisition of the newborn liver to convert E2 into less active metabolites. By contrast, E2 treatment had no effect on physiological neonatal *Cyp1b1* down-regulation and *Gsta2* up-regulation of expression in the liver. *Cyp1b1* response to E2 exposure seems to be organ-specific since its expression is either inducible by E2 and deoxymiroestrol (a strong phyto-estrogen in mouse hepatocyte primary culture [69]) or down-regulated by estrogenic compounds in peripheral organs such as rat and mouse testis and the reproductive tract of developing female rats [38,70,71]. This may also be the case for *Gst* enzymes as genistein increases *Gsta2* mRNA levels and decreases *Gstp1* mRNA levels without affecting general GST activity in adult males, and deoxymiroestrol increases *Gsta2* expression in adult mice hepatocyte primary culture [69,72]. Finally, hepatic *Ugt1a1* mRNA levels were not modified by E2. This would suggest that E2 treatment has no influence on the expression of this enzyme at this age, unlike in adult mouse livers where its expression is inducible [73]. Nevertheless, the absence of effect of E2 on *Ugt1a1* and *Gsta2* mRNA neonatal profiles does not preclude a modification of expression of other *Gst* and *Ugt*, or a modification of enzyme activity. By targeting selected enzymes of the metabolizing pathway, E2 treatment may well favor one or more metabolic branches over others. Collectively, our data led us to hypothesize that by reproducing the maternal E2 environment, high levels of E2 levels would force the liver to remain in a relative immature state. Therefore, as suggested in the ovary, lifting the maternal E2 environment at birth could enable maturation of the newborn liver and development of its own detoxification machinery.

Arguments in Favor of the Existence of an Ovarian Local Metabolic Response to E2 Exposure

Neonatal estrogen exposure classically induce immediate transcriptomic effects and long-lasting physio-pathological effects in reproductive tissues such as the testis, ovary, uterus, oviduct and hypothalamus, but also in other tissues including bone, kidney and liver [74]. The search of E2 target genes is the main outcome that is commonly investigated at the transcriptomic level. Amongst target genes, E2 induces modifications of the detoxification machinery in the rat adult female liver, which is the major drug-

metabolizing organ of the body [75,76], but also in reproductive organs such as uterus, testis and fetal and juvenile ovaries [38,77,78]. In agreement, our results suggest that local mechanisms may exist in the neonatal ovary as well. Indeed, the ovary responds to E2 exposure by modifying the expression of several E2 metabolism pathway enzymes. Although *Hsd17b2* mRNA was not thought to be expressed in the immature and mature rat ovary [79], we found an up-regulation above basal levels in response to a 10 μ g E2 injection that may increase the capability of the ovary to transform E2 into its less active E1 metabolite [80]. On the opposite, the PND0 to PND1 up-regulation of *Cyp1b1* and *Cyp2b1/2* mRNA levels was not observed in response to a 10 μ g E2 injection, suggesting a possible decreased capability to locally transform circulating E2 and E1 into excretable hydroxyl- and methoxy-estrogen metabolites. We propose that, as in the liver, E2 treatment could also counter local ovarian acquisition of the machinery involved in its own metabolism, as illustrated by a similar inhibition of post-natal *Cyp2b1/2* mRNA up-regulation. The local ovarian mRNA up-regulation of *Hsd17b2* may locally rescue, at least in part, the absence of up-regulation in the liver.

An auto-sensory mechanism adjusting the expression of detoxification enzymes would involve local signaling via estrogen receptors. In agreement with previous reports in the rat [81,82], we confirm lower expression of *Esr1* in the neonatal rat ovary than in the oviduct, expression of *Esr2* in (pre-)granulosa cells which increases with follicular growth, and low expression of *Esr2* in the cytoplasm of oocytes at birth. We also extend the knowledge of *Gper* expression pattern in the rat to the neonatal period in granulosa cells, oocytes, and surface epithelial cells of the ovary and the oviduct, consistent with the pattern reported in the hamster [19,83]. Altogether, the neonatal rat ovary has the machinery to respond to E2. In contrast to other organs or developmental periods, we were not able to show any modification of either *Esr1* or *Esr2* expression associated with the 10 μ g/d E2 treatment. *Gper* mRNA, which has not been described as a classical E2 target gene to our knowledge, did not display a physiological increase between PND0 and PND1 in response to E2. In the hamster, *Gper* was proposed to mediate E2 action on follicle formation, as *in vitro* ablation with small interfering RNAs markedly suppressed estrogen-stimulated primordial follicle formation [19]. E2-disruption of post-natal *Gper* increase may suggest a similar role of *Gper* in follicle formation in the rat. The same trend of response to E2, albeit not statistically significant, was found for *Nr1i2* expression in agreement with mouse ovarian data). Interestingly, the sharp increase in *Nr1i2* expression in the prenatal mouse ovary followed by a post-natal decrease at PND3, that we also found in the rat ovary, was proposed to reflect a role for this receptor in protecting the feto-maternal system from the toxic effect of endogenous steroids and foreign substrates [36]. Unfortunately, *Nr1i2* mRNA levels were below our *in situ* hybridization detection levels so we were unable to identify the cells that express *Nr1i2*. The low expression level of *Nr1i2*, together with the absence of modification of its expression by E2, reduces the likelihood of its involvement in the response to E2 high levels.

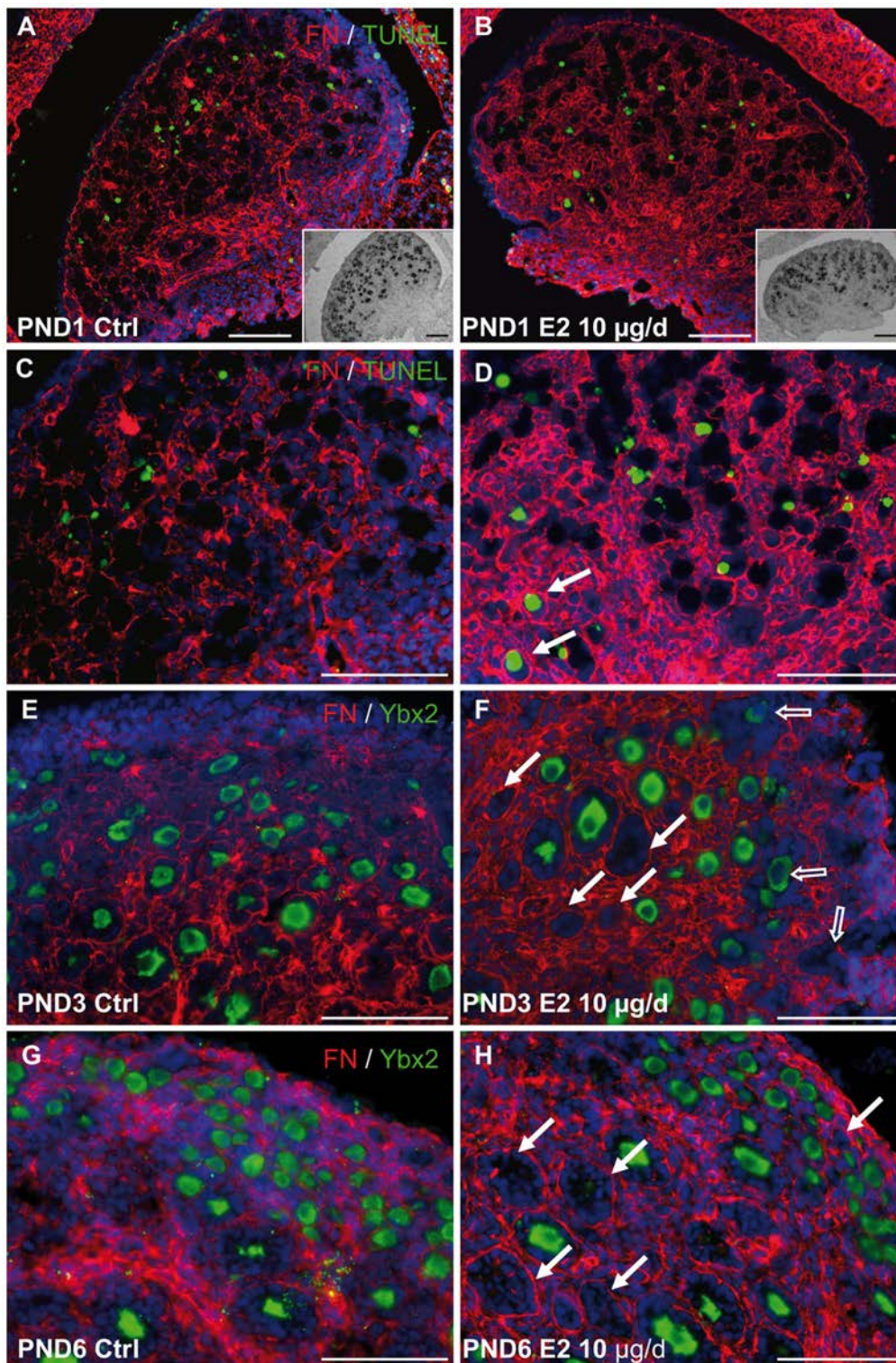


Figure 6. Abnormalities of follicle formation. A–D. Comparison of apoptosis using TUNEL (green), fibronectin (red) and nuclei (DAPI, blue) in control (A, C) or 10 μ g-E2 treated (B, D) ovaries at PND1 highlights physiological oocyte apoptosis in the areas of ovarian cords remodeling in control ovaries, and additional oocyte apoptosis in already formed follicles in E2-treated ovaries (arrows). Insets in A–B show *in situ* hybridization against Ybx2 performed on the same section. C–D are higher magnifications of A–B. Scale bar: 100 μ m. E–H. Comparison of oocytes labeled with Ybx2 (green) and basement membrane labeled with fibronectin (red) and nuclei (DAPI, blue) in PND3 (E–F) and PND6 (G–H) control (E, G) and 10 μ g E2-treated ovaries (F, H) show incomplete basement membrane remodeling at PND3 in E2-treated ovaries (open arrows) and empty follicles at PND3 and PND6 (arrows). Pictures are representative from 4–6 ovaries. Scale bar: 100 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0082175.g006

Estradiol and Oocyte Survival

Although the 10 µg/d E2 treatment induced a local modification in the expression of genes encoding metabolism enzymes, we showed that E2 exposure at the time of follicle formation induced a dose-dependent ovotoxicity. The effect of E2 on the neonatal ovary is often evaluated at the follicle level and previous studies have shown that neonatal E2 exposure induces a moderate reduction in the rate of primordial follicle assembly, a lower level of initial primordial-to-primary follicle transition [16] and fewer layered follicles at PND6 [84]. Similarly, neonatal exposure to BPA reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary [28]. Nevertheless, there may be multiple effects of E2 on follicle assembly and/or primordial follicle activation. By focusing on the total oocyte number, we showed a rapid effect of E2 on oocyte survival, irrespective of the structure in which it is included. Further studies are necessary to identify the fine mechanisms by which E2 affects oocyte survival. However, our results contrast with those reported in mice in which a similar range of EB doses (0.1 to 1 µg/mouse) decrease the number of apoptotic germ cells at PND5 [85–87]. In other *in vivo* studies in mice, 10 or 20 µg/day of ethinyl estradiol did not modify whereas 100 µg/day increased the number of oocyte per section [18,88,89], highlighting the importance of the dose. In agreement, studies in hamsters revealed that doses of E2 within the physiological range reduced apoptosis and stimulated the formation of follicles, and that doses above a threshold level had no effect on primordial follicle formation but significantly up-regulated oocyte apoptosis [20]. We show a dose-effect of E2 on oocyte depletion in the rat but no biphasic response.

There may be several reasons for species-differences in ovarian E2 sensitivity. Distinct estrogen receptivity at the time of follicle assembly are unlikely because of the highly conserved expression profiles of the different estrogen receptors, especially between these rodent species [82,83,90]. Subtle species differences between rat and mice have been reported in the fine mechanisms governing the programmed cell death of oocytes at birth. Neonatal oocyte attrition in mice involves apoptosis and autophagy mechanisms in different cells [91], but in rats, dying oocytes can share several features of both processes [14]. Alternatively, the xeno-estrogen Bisphenol A was shown to hamper meiotic progression, resulting in oocyte apoptosis in mice and humans [92,93]. This indicates that E2 could interfere with the timing of meiosis arrest during follicle histogenesis and ultimately induce oocyte death. Our search for meiosis or oocyte-specific marker profiles in response to E2 treatment showed that only *Nobox* expression was modified in ovaries of E2-treated females. Indeed, *Nobox* mRNA did not display the up-regulation observed between PND0-1 and PND2 in control ovaries. This increase in controls may reflect the expression of *Nobox* in oocytes of primordial and growing follicles and thus the maturation of the organ. In E2-treated ovaries, the absence of increased *Nobox* expression between PND1 and PND2 could indicate a default in the primordial-to-primary follicle transition or a poor growth of the first wave of follicles. However, this is countered by the absence of modification of expression in several other oocyte-specific genes. Since mice lacking *Nobox* display accelerated post-natal oocyte loss associated with a decrease in the expression of numerous oocyte-specific genes [44,94], the absence of increase of *Nobox* could involve this pathway in the mechanism by which oocytes disappear after E2 exposure. This alternative mechanism would correlate well with the delayed decrease in oocyte numbers between PND2 and PND3. Nevertheless, although we were not able to detect any changes of the number of TUNEL-positive apoptotic oocytes, or global expression of apoptosis-related genes, we showed difference

in areas and structures where apoptotic oocytes were included. This would suggest that E2 induces abnormal apoptosis in already formed follicles rather than increasing physiological process. Abnormal apoptosis of oocytes in already formed follicles correlates well with the observation of numerous empty follicles at PND3 and PND6. At the organ level, the number of oocytes involved in cell death is very low; this would explain the absence of variation of several selected oocyte markers. Further work is needed to define the fine mechanisms of oocyte disappearance after E2 exposure.

Estradiol and Abnormalities of Follicle Formation?

MOFs are a hallmark of several mammalian species but their etiology is unknown [95]. Studies using E2 and E2-mimetics in mice suggest that a decrease in oocyte apoptosis and cyst breakdown ultimately results in MOFs [18,86]. By contrast in the rat, massive oocyte depletion following fetal irradiation is associated with an increased incidence of MOFs [96]. Consequently, the etiology of MOFs in rat and mouse may well differ. We show here that E2 exposure is associated with neonatal oocyte depletion but we did not observe MOFs in older ovaries (at PND6, PND21 and in adults, data not shown). This is in agreement with studies in rats exposed to DES and BPA where MOFs were not reported, or disappeared before puberty [27,28,51,84]. The timing of oocyte depletion, between PND2 and PND3 and the presence of apoptotic oocytes in already formed follicles at PND1 suggest that the absence of MOFs may be explained by a depletion of oocytes after follicle formation.

It is well established that the moment of germ cell depletion will determine the subsequent ovarian phenotype. Irradiation-induced fetal depletion of germ cells in the rat results in streak gonads, whereas PND5-oocyte depletion leads to empty-primary follicles evolving into cord-like structures where granulosa cells trans-differentiate into Sertoli-like cells [97–99]. Neonatal exposure to E2 in the ovaries leads to a phenotype that is more closely related with neonatal irradiation, with a decreased oocyte pool. We here show that neonatal E2 exposure induced oocyte depletion in already formed follicles. Although further investigations on the fate of pathological empty follicles are needed, we cannot exclude the possibility that neonatal E2 exposure may also target the first wave of follicle growth and follicle dynamics at the end of the first week. Indeed, studies focusing on follicle dynamics in infantile rat ovaries after neonatal E2 exposure have produced contradictory results: some indicate that E2 increases primordial-to-primary follicle transition *in vitro* and *in vivo* at PND8 while others report a decrease in the number of layered follicles at PND6 [16,28,84]. However, by focusing on total oocyte numbers, our study shows that E2 affected oocyte survival independently of the structure in which oocytes are enclosed, in addition to its possible impact on follicle dynamics.

Our study shows that a neonatal exposure to high E2 levels interferes with the maturation of expression of key detoxification tools in the liver and ovaries. In the rat ovary, E2 is ovotoxic in a dose-dependent manner. A special care must be taken when assigning the E2 reference dose in future studies to enable accurate comparisons with environmental contaminants displaying estrogenic activities.

Supporting Information

Figure S1 Expression of *Esr1* in the neonatal rat ovary. A–F. *In situ* hybridizations for *Esr1* (A, C, E), and *Esr1* sense probe (B, D, F) in PND2 ovaries show a high level of expression of *Esr1* in the epithelium of the differentiating oviduct (compare C to D),

and in some cells of the mesenchyme of the oviduct (open arrow in C) and a close-to-background expression in oocytes (arrows in E, compare to F) and an expression in the ovarian surface epithelium (E, compare with F). G Double staining of E with Ybx2 by immunofluorescence to labeled oocytes (arrows, red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). H Merged pictures of immunofluorescence for Esr1 (red), Ybx2 (green) and cell nuclei (blue) in a PND1 ovary shows a high expression of Esr1 in cells of the oviduct mesenchyme (open arrow), an expression in epithelial cells of the ovarian surface and follicles (arrowheads) and in oocytes (arrow). Scale bars: 100 μ m. (TIF)

Table S1 GC-MS serum analytical control validation. LLOQ: low limit of quantification; QC: quality control.

References

- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS (1995) Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod* 53: 1198–1207.
- Weisz J, Ward IL (1980) Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106: 306–316.
- Konkle AT, McCarthy MM (2011) Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 152: 223–235.
- Lei L, Jin S, Mayo KE, Woodruff TK (2010) The interactions between the stimulatory effect of follicle-stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis. *Biol Reprod* 82: 13–22.
- Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, et al. (2002) Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 143: 4775–4787.
- Meijs-Roelofs HM, Uilenbroek JT, de Jong FH, Welschen R (1973) Plasma oestradiol-17 β and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats. *J Endocrinol* 59: 295–304.
- de Zwart L, Scholten M, Monbaliu JG, Annaert PP, Van Houdt JM, et al. (2008) The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. *Reprod Toxicol* 26: 220–230.
- Lee JS, Ward WO, Liu J, Ren H, Vallanath B, et al. (2011) Hepatic xenobiotic metabolizing enzyme and transporter gene expression through the life stages of the mouse. *PLoS One* 6: e24381.
- Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124: 43–101.
- Pepling ME (2012) Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction* 143: 139–149.
- Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, Coudouel N, Le Magueresse-Battistoni B, et al. (2005) Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Dev Biol* 277: 403–416.
- Beaumont HM, Mandl AM (1962) A quantitative and cytological study of oögonia and oöcytes in the foetal and neonatal RAT. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 155: 557–579.
- Burgoyne PS, Baker TG (1985) Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. *J Reprod Fertil* 75: 633–645.
- Escobar ML, Echeverria OM, Ortiz R, Vazquez-Nin GH (2008) Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis* 13: 1253–1266.
- Ghafari F, Gutierrez CG, Hartsorne GM (2007) Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol* 7: 87.
- Kezele P, Skinner MK (2003) Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 144: 3329–3337.
- Nilsson EE, Skinner MK (2009) Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 313: 9–16.
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME (2007) Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 148: 3580–3590.
- Wang C, Prossnitz ER, Roy SK (2008) G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary. *Endocrinology* 149: 4452–4461.
- Wang C, Roy SK (2007) Development of primordial follicles in the hamster: role of estradiol-17 β . *Endocrinology* 148: 1707–1716.
- Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, Pepe GJ (2002) Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol Reprod* 67: 1148–1156.
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S (2001) Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Dev Dyn* 221: 443–453.
- Iguchi T, Fukazawa Y, Uesugi Y, Takasugi N (1990) Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 43: 478–484.
- Iguchi T, Kamiya K, Uesugi Y, Sayama K, Takasugi N (1991) In vitro fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* 5: 359–363.
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, Pepling M (2006) Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod* 74: 161–168.
- Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, et al. (2002) Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16: 107–116.
- Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, et al. (2011) Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol* 31: 280–289.
- Rodriguez HA, Santambrosio N, Santamaria CG, Munoz-de-Toro M, Luque EH (2010) Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 30: 550–557.
- Bateman HL, Patisaul HB (2008) Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology* 29: 988–997.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, et al. (2004) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145: 4565–4574.
- Giton F, Fiet J, Cornu JN, Cussenot O, Belanger A, et al. (2011) Serum sex steroids measured in middle-aged European and African-Caribbean men by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur J Endocrinol* 165: 917–924.
- Labrie F, Belanger A, Belanger P, Berube R, Martel C, et al. (2007) Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 178–188.
- Giton F, Caron P, Berube R, Belanger A, Barbier O, et al. (2010) Plasma estrone sulfate assay in men: Comparison of radioimmunoassay, mass spectrometry coupled to gas chromatography (GC-MS), and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Clin Chim Acta* 411: 1208–1213.
- Kezele PR, Aguc JM, Nilsson E, Skinner MK (2005) Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biol Reprod* 72: 241–255.
- Chalmel F, Primig M (2008) The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 9: 86.
- Masuyama H, Hiramatsu Y, Mizutani Y, Inoshita H, Kudo T (2001) The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol Cell Endocrinol* 172: 47–56.
- Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, Escande A, Bartegi A, et al. (2007) Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol Lett* 170: 19–29.
- Daston GP, Naciff JM (2005) Gene expression changes related to growth and differentiation in the fetal and juvenile reproductive system of the female rat: evaluation of microarray results. *Reprod Toxicol* 19: 381–394.
- Adevale HB, Jefferson WN, Newbold RR, Patisaul HB (2009) Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod* 81: 690–699.
- Tanaka H, Pereira LA, Nozaki M, Tsuchida J, Sawada K, et al. (1997) A germ cell-specific nuclear antigen recognized by a monoclonal antibody raised against mouse testicular germ cells. *Int J Androl* 20: 361–366.
- Lechowska A, Bilinski S, Choi Y, Shin Y, Kloc M, et al. (2011) Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *J Assist Reprod Genet* 28: 583–589.

42. Miyagi Y, Kerr S, Sugiyama A, Asai A, Shibuya M, et al. (1995) Abundant expression of translation initiation factor EIF-4E in post-meiotic germ cells of the rat testis. *Lab Invest* 73: 890–898.
43. Paredes A, Garcia-Rudaz C, Kerr B, Tapia V, Dissen GA, et al. (2005) Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. *Endocrinology* 146: 5267–5277.
44. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157–1159.
45. Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, et al. (2005) Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol* 281: 160–170.
46. Soyak SM, Amleh A, Dean J (2000) FGFalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645–4654.
47. Wang N, Zhang P, Guo X, Zhou Z, Sha J (2011) Hnmpk, a protein differentially expressed in immature rat ovarian development, is required for normal primordial follicle assembly and development. *Endocrinology* 152: 1024–1035.
48. Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN (1992) The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 194: 177–192.
49. Shaikh AA (1971) Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 5: 297–307.
50. Bertolasio J, Fyfe S, Snyder BW, Davis AM (2011) Neonatal injections of methoxychlor decrease adult rat female reproductive behavior. *Neurotoxicology* 32: 809–813.
51. Kato H, Ota T, Furuhashi T, Ohta Y, Iguchi T (2003) Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 17: 283–288.
52. Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, et al. (2009) Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 150: 2359–2367.
53. Patisaul HB, Losa-Ward SM, Todd KL, McCaffrey KA, Mickens JA (2012) Influence of ERbeta selective agonism during the neonatal period on the sexual differentiation of the rat hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Biol Sex Differ* 3: 2.
54. Shibutani M, Masutomi N, Uneyama C, Abe N, Takagi H, et al. (2005) Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology* 208: 35–48.
55. Oriowo MA, Landgren BM, Stenstrom B, Diczfalussy E (1980) A comparison of the pharmacokinetic properties of three estradiol esters. *Contraception* 21: 415–424.
56. Weniger JP, Zeis A, Chourauqui J (1993) Estrogen production by fetal and infantile rat ovaries. *Reprod Nutr Dev* 33: 129–136.
57. Zhu BT, Conney AH (1998) Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19: 1–27.
58. Suchar LA, Chang RL, Thomas PE, Rosen RT, Lech J, et al. (1996) Effects of phenobarbital, dexamethasone, and 3-methylcholanthrene administration on the metabolism of 17 beta-estradiol by liver microsomes from female rats. *Endocrinology* 137: 663–676.
59. You L, Chan SK, Bruce JM, Archibeque-Engle S, Casanova M, et al. (1999) Modulation of testosterone-metabolizing hepatic cytochrome P-450 enzymes in developing Sprague-Dawley rats following in utero exposure to p, p'-DDE. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 197–205.
60. Raftogiannis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J (2000) Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 113–124.
61. Lievertz RW (1987) Pharmacology and pharmacokinetics of estrogens. *Am J Obstet Gynecol* 156: 1289–1293.
62. Chapple RH, Tizoto PC, Wells KD, Givan SA, Kim J, et al. (2013) Characterization of the rat developmental liver transcriptome. *Physiol Genomics* 45: 301–311.
63. Odum J, Orton TC (1983) Hepatic microsomal glucuronidation of clofibrate acid in the adult and neonate albino rat. *Biochem Pharmacol* 32: 3565–3569.
64. Blair IA (2010) Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future. *Steroids* 75: 297–306.
65. Lepine J, Bernard O, Plante M, Tetu B, Pelletier G, et al. (2004) Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5222–5232.
66. Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129: 171–193.
67. Luu-The V, Pelletier G, Labrie F (2005) Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 269–276.
68. Gershon E, Hourvitz A, Reikhav S, Maman E, Dekel N (2007) Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *Faseb J* 21: 1893–1901.
69. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Putalun W, Sakuma T, Kawasaki Y, et al. (2011) Modified expression of aryl hydrocarbon receptor-related genes by deoxymiroestrol, a phytoestrogen, in mouse hepatocytes in primary culture. *J Ethnopharmacol* 137: 902–908.
70. Deb S, Tai JK, Leung GS, Chang TK, Bandiera SM (2011) Estradiol-mediated suppression of CYP1B1 expression in mouse MA-10 Leydig cells is independent of protein kinase A and estrogen receptor. *Mol Cell Biochem* 358: 387–395.
71. Leung GS, Kawai M, Tai JK, Chen J, Bandiera SM, et al. (2009) Developmental expression and endocrine regulation of CYP1B1 in rat testis. *Drug Metab Dispos* 37: 523–528.
72. Wiegand H, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Kruse HP, Kulling S, et al. (2009) Effect of dietary genistein on Phase II and antioxidant enzymes in rat liver. *Cancer Genomics Proteomics* 6: 85–92.
73. Buckley DB, Klaassen CD (2009) Mechanism of gender-divergent UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in mouse liver and kidney. *Drug Metab Dispos* 37: 834–840.
74. Diel P (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 127: 217–224.
75. Singhal R, Shankar K, Badger TM, Ronis MJ (2009) Hepatic gene expression following consumption of soy protein isolate in female Sprague-Dawley rats differs from that produced by 17beta-estradiol treatment. *J Endocrinol* 202: 141–152.
76. Stahlberg N, Merino R, Hernandez LH, Fernandez-Perez L, Sandelin A, et al. (2005) Exploring hepatic hormone actions using a compilation of gene expression profiles. *BMC Physiol* 5: 8.
77. Naciff JM, Hess KA, Overmann GJ, Torontali SM, Carr GJ, et al. (2005) Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17alpha-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicol Sci* 86: 396–416.
78. Naciff JM, Overmann GJ, Torontali SM, Carr GJ, Khambatta ZS, et al. (2007) Uterine temporal response to acute exposure to 17alpha-ethynyl estradiol in the immature rat. *Toxicol Sci* 97: 467–490.
79. Akinola LA, Poutanen M, Vihko R, Vihko P (1997) Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats. *Endocrinology* 138: 2886–2892.
80. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863–870.
81. Mowa CN, Iwanaga T (2000) Developmental changes of the oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of the rat—an analysis by in situ hybridization. *J Endocrinol* 167: 363–369.
82. Sar M, Welsch F (1999) Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 140: 963–971.
83. Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, et al. (2009) Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol* 202: 223–236.
84. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S (2002) Increased expression of Mullerian-inhibiting substance correlates with inhibition of follicular growth in the developing ovary of rats treated with E2 benzoate. *Endocrinology* 143: 304–312.
85. De Pol A, Benelli A, Arletti R, Cavazzuti E, Sena P, et al. (2001) Influence of estrogens and oxytocin on germ cells death in the neonatal mammalian ovary. *Ital J Anat Embryol* 106: 233–239.
86. Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, et al. (2009) Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biol Reprod* 81: 1002–1009.
87. Marzona L, Arletti R, Benelli A, Sena P, De Pol A (2001) Effects of estrogens and oxytocin on the development of neonatal mammalian ovary. *In Vivo* 15: 271–279.
88. Karavan JR, Pepling ME (2012) Effects of estrogenic compounds on neonatal oocyte development. *Reprod Toxicol* 34: 51–56.
89. Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE (2007) Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* 148: 1968–1976.
90. Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR (2000) Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod* 62: 310–317.
91. Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, et al. (2011) Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction* 141: 759–765.
92. Brieno-Enriquez MA, Robles P, Camats-Tarruella N, Garcia-Cruz R, Roig I, et al. (2011) Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development. *Hum Reprod* 26: 2807–2818.
93. Zhang HQ, Zhang XF, Zhang LJ, Chao HH, Pan B, et al. (2012) Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep* 39: 5651–5657.
94. Choi Y, Qin Y, Berger MF, Ballow DJ, Bulyk ML, et al. (2007) Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking Nobox. *Biol Reprod* 77: 312–319.
95. Telfer E, Gosden RG (1987) A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 81: 137–147.
96. Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S (2006) Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biol Reprod* 75: 749–759.

97. Guigon CJ, Coudouel N, Mazaud-Guittot S, Forest MG, Magre S (2005) Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* 146: 2992–3004.
98. Guigon CJ, Magre S (2006) Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 74: 450–458.
99. Whitworth DJ (1998) XX germ cells: the difference between an ovary and a testis. *Trends Endocrinol Metab* 9: 2–6.

Figure S1.

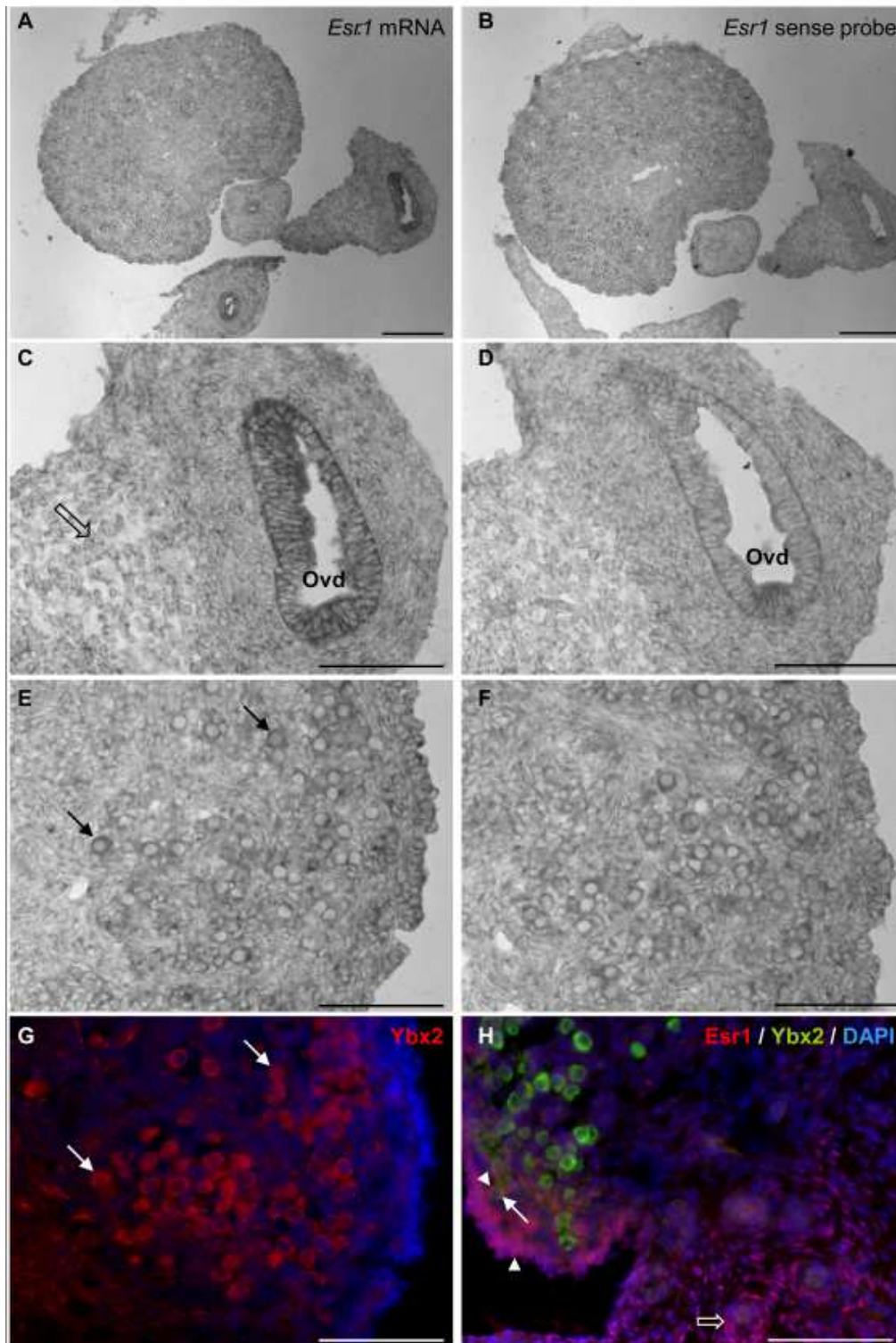


Figure S1. Expression of *Esr1* in the neonatal rat ovary. A–F. *In situ* hybridizations for *Esr1* (A, C, E), and *Esr1* sense probe (B, D, F) in PND2 ovaries show a high level of expression of *Esr1* in the epithelium of the differentiating oviduct (compare C to D), and in some cells of the mesenchyme of the oviduct (open arrow in C) and a close-to-background expression in oocytes (arrows in E, compare to F) and an expression in the ovarian surface epithelium (E, compare with F). G Double staining of E with Ybx2 by immunofluorescence to labeled oocytes (arrows, red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). H Merged pictures of immunofluorescence for *Esr1* (red), Ybx2 (green) and cell nuclei (blue) in a PND1 ovary shows a high expression of *Esr1* in cells of the oviduct mesenchyme (open arrow), an expression in epithelial cells of the ovarian surface and follicles (arrowheads) and in oocytes (arrow). Scale bars: 100 μ m.

Table S1.

Accuracy	Analytes	Target ions analyte / IS (amu)	Range of detection (pg/ml)	Mean (43 runs) <i>Intra- & Inter assay CVs (%)</i>			
				LLOQ	Low QC	Middle QC	High QC
Accuracy for E1, E2, E1-S and E2-S measured by GC-MS in human samples : -3.9 % - +3.5 % (n = 6)	E1	464 / 468	8 - 810	7.9	14.4	77.9	198.9
				7.4 - 9.5	4.3 - 4.7	3.1 - 3.3	2.6 - 3.0
	E2	660 / 664	2 - 405	2.1	9.8	48.0	198.3
				8.9 - 10.5	3.5 - 4.1	2.6 - 3.0	1.5 - 1.7
	E1-S	464 / 468 (after solvolysis)	50 - 6000	49.8	500.4	1454	2992
				8.7 - 11.0	4.0 - 4.4	3.1 - 3.4	2.8 - 2.9
	E2-S	660 / 664 (after solvolysis)	10 - 1350	10.1	101.3	299.5	599.0
				3.9 - 5.4	3.0 - 4.2	3.0 - 4.1	2.8 - 3.2

Table S1. GC-MS serum analytical control validation. LLOQ: low limit of quantification; QC: quality control.

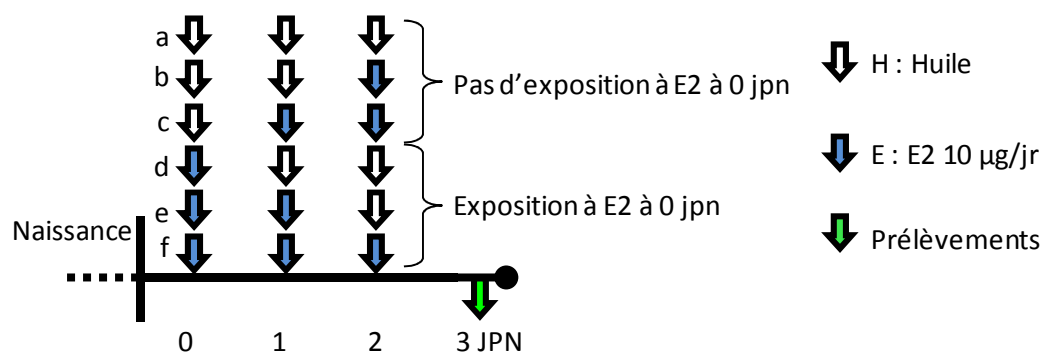


Figure 49 : Stratégie de traitement mise en place afin de caractériser la fenêtre critique de sensibilité ovarienne. 6 séquences d'injection (notées de « a » à « f ») ont été utilisées.

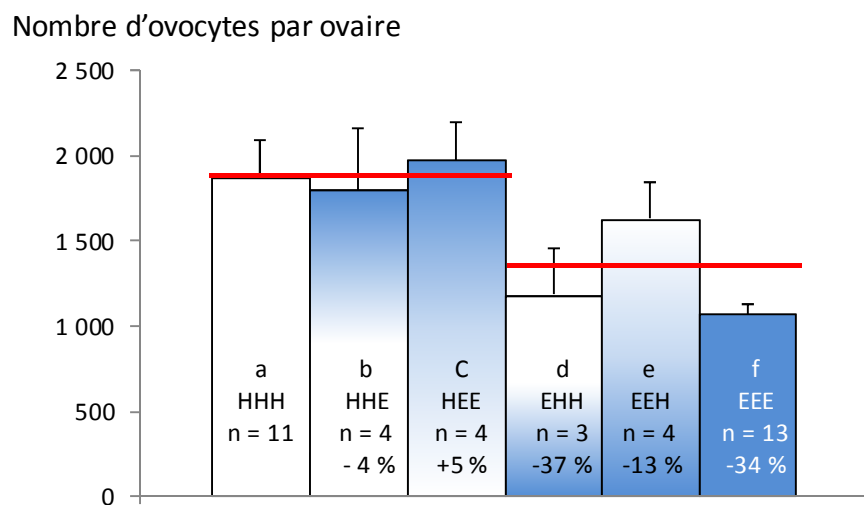


Figure 50 : Impact à 3 jpn d'un traitement à l'E2 10 µg/jr sur le nombre d'ovocytes par ovaire.

Après 3 injections (dont les séquences notées de « a » à « f » ont été présentées dans la figure précédente), les animaux n'ayant pas reçu d'E2 le jour de leur naissance (colonnes de gauche) ont un nombre d'ovocytes par ovaire similaire au témoin (+/- 5 %). Les animaux ayant reçu de l'E2 lors de la première injection (colonnes de droite) présentent une tendance à la baisse du nombre d'ovocytes par ovaire.

H : Injection d'huile

E : Injection de 10 µg E2

3. RÉSULTATS ANNEXES

Comme les traitements le premier jour de la vie induisent des phénotypes plus sévères que les traitements débutés plus tard, tant le développement de la glande mammaire (Bern *et al.*, 1983) que sur la puberté et la folliculogenèse à l'âge adulte (Cruz *et al.*, 2012), nous avons souhaité affiner davantage la fenêtre critique de sensibilité dans l'ovaire. Pour cela, nous avons élaboré des séquences d'injections présentées en figure 49. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 50. Compte tenu du faible effectif dans chaque groupe, seules des tendances sont représentées. Il semble toutefois que les animaux ayant été exposés dès la naissance à l'œstradiol aient moins d'ovocytes dans les ovaires à 3 jpn que ceux ayant reçu l'injection témoin à 0 jpn. Ceci est cohérent avec les observations faites sur la puberté et le développement de la glande mammaire et confirme l'importance majeure du contexte endocrine à 0 jpn pour la survie ovocytaire.

II. Exposition néonatale aux œstrogènes et conséquences à long terme sur l'ovaire

1. INTRODUCTION

Dans l'ovaire, la fragmentation des cordons ovariens conduit à la formation des follicules primordiaux. La mise en place de ce stock de follicules primordiaux revêt une importance particulière puisque ce stock, formé dans les premiers jours de vie chez le rongeur, est non renouvelable (Zuckerman, 1951). La multiplication de cellules germinales dans l'ovaire adulte serait possible (Johnson *et al.*, 2004) toutefois le bon déroulement de la formation folliculaire néonatale reste capital pour la fertilité de l'adulte. Chez la souris, l'exposition néonatale aux PEO favorise la survie ovocytaire (Jefferson *et al.*, 2006; Pepling *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2003) alors que chez la ratte elle réduit le nombre d'ovocytes (Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008 ; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2011 ; Chalmey *et al.*, 2013). Les PEO inhibent la fragmentation des cordons ovariens, favorisant la formation de MOF (Chen *et al.*, 2007b; Kipp *et al.*, 2007; Losa *et al.*, 2011 ; Rodriguez *et al.*, 2010). Les PEO peuvent aussi affecter le passage des follicules au stade primaire, c'est-à-dire l'entrée en croissance des follicules, soit en la ralentissant (souris : Kim *et al.*, 2009, Karavan & Pepling, 2012, Zhang *et al.*, 2012b; ratte : Kezele & Skinner, 2003; Ahn *et al.*, 2012) soit en l'accéléralant (souris : Chao *et al.*, 2012; ratte : Yamamoto *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2010). Les PEO ont également fait la preuve de leur action sur l'hypothalamus et l'hypophyse, centres régulateurs de la fonction ovarienne, notamment en réduisant le nombre de neurones à kiss (Bateman & Patisaul, 2008, Patisaul *et al.*, 2009) et en altérant la sécrétion des gonadotropines (Pinilla *et al.*, 1993). L'utérus est lui aussi une cible des PEO qui y induisent une dérégulation du métabolisme énergétique (Yin *et al.*, 2012).

La dose d'exposition est un facteur déterminant quant aux effets provoqués par les PEO. Ainsi l'EB occasionne une réduction dose-dépendante du nombre de neurones kiss dans l'hypothalamus à l'approche de la puberté (Navarro *et al.*, 2009). Dans l'ovaire, la dose de BPA est positivement corrélée à la réduction du poids de l'organe à 80 jpn (Kato *et al.*, 2003) et le nombre d'ovocytes est réduit à 3 jpn par des doses croissantes d'E2 (Chalmey *et al.*, 2013). Chez le hamster, une faible dose d'EC favorise la survie ovocytaire alors qu'une forte dose augmente l'apoptose (Wang & Roy, 2007). Les effets d'une œstrogénisation néonatale sont souvent persistants bien après l'arrêt de l'exposition, tant sur les étages supérieurs de l'axe HHG (Bateman & Patisaul, 2008; Patisaul *et al.*, 2009) que sur l'ovaire (Sotomayor-Zarate *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012). Ce type de traitement induit généralement l'avancement de la puberté, constatée chez les rongeurs grâce à l'ouverture vaginale (Lewis *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Nikaido *et al.*, 2005; Losa *et al.*, 2011) et une baisse de la fertilité chez de nombreuses espèces (Brebis : Bennetts *et al.*, 1946; Rongeurs : McLachlan *et al.*, 1982; Newbold *et al.*, 1998; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008; Varayoud *et al.*, 2011; Femme : Palmer *et al.*, 2001).

L'infertilité survenant plus ou moins rapidement selon les études est en partie liée au phénotype ovarien résultant de l'exposition à des PEO. En effet, de nombreuses anomalies sont observées. Parmi elles, l'augmentation de la proportion des follicules en croissance atrophiques (Yamamoto *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012; Peretz *et al.*, 2012), la présence de kystes (Kato *et al.*, 2003; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008) et surtout la réduction du nombre (voire l'absence) de corps jaunes (Williams *et al.*, 1989; Kouki *et al.*, 2003; Nikaido *et al.*, 2004; Adewale *et al.*, 2009) sont fréquemment constatées.

La baisse de la fertilité est aussi un phénomène physiologique lié à l'âge et dû au déclin des fonctions ovariennes combiné au déclin des autres organes impliqués dans la fonction de reproduction (pour revue, Finn, 1962; Wise, 1999). Dans l'ovaire, un premier groupe de follicules (« la première vague ») entrent en croissance très rapidement après leur formation. Ils sont supposés participer à l'établissement de la communication entre l'ovaire et ses centres régulateurs sans atteindre l'ovulation (Guigon *et al.*, 2003a). Ces premières vagues, stériles, présentent notamment une forte expression d'act β et de Cyp19a1 (Guigon *et al.*, 2003a ; Hickey *et al.*, 1988 ; Mazaud *et al.*, 2002) supposées être liées au pic d'inha, act β et E2 du milieu de la période infantile (12 – 15 jpn, Meijs-Roelofs *et al.*, 1973 ; Rivier & Vale, 1987 ; Wilson & Handa, 1998). Après la puberté, des vagues de follicules continuent à être recrutées de façon cyclique pour fournir les gamètes femelles nécessaires à la fécondation. La réserve de follicules s'amenuise donc progressivement avec le temps (Jones & Krohn, 1961; Nishijima *et al.*, 2013) réduisant le nombre de follicules recrutés à chaque cycle. Vers 11 mois chez la ratte, cette réduction du nombre de follicules en croissance entraîne le déclin progressif de la synthèse des hormones ovariennes (Nelson *et al.*, 1981). Le déclin de la réserve folliculaire est donc au cœur du phénomène de sénescence reproductive. Or cette réserve folliculaire est la cible des PEO administrés en période périnatale.

Nous avons choisi de poursuivre notre étude sur le stock ovocytaire suite à une œstrogénisation néonatale et de comparer les effets sur l'ovaire et la fonction de reproduction de deux doses d'œstradiol: la dose de référence utilisée dans de nombreuses études (10 μ g) (Ikeda *et al.*, 2001; Patisaul *et al.*, 2009; Bertolasio *et al.*, 2011) induisant une déplétion de plus de 30 % du stock ovocytaire à 3 jpn et une dose 100 fois plus faible sans effet sur le stock d'ovocytes à 3 jpn (Chalmey *et al.*, 2013). Cette étude a pour but 1) de déterminer si cette faible dose d'œstradiol sans effet immédiat sur la survie ovocytaire juste après la naissance peut avoir des effets à long terme sur la vie reproductive des femelles adultes et 2) de caractériser ces effets s'ils existent.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les différentes techniques utilisées ont été détaillées dans la section « Matériel et Méthodes » de ce manuscrit.

Les animaux sont issus de l'élevage du laboratoire ou de l'élevage industriel Janvier (Le Genest St Isle, 53). À la naissance, les rattes nouveau-nées sont réparties en 3 groupes recevant un traitement de 3

jours (0, 1 et 2 jpn) au rythme d'une injection sous-cutanée de 17 β -œstradiol quotidienne, la première étant administrée 4 heures après la naissance. Le premier groupe reçoit 3 injections d'huile de maïs (témoin), le second reçoit 3 injections de 0.1 μ g/jr de 17 β -œstradiol et le dernier 3 injections de 10 μ g/jr de 17 β -œstradiol. Des animaux sont sacrifiés régulièrement (à 3, 6, 21 jpn ou à 8 mois) afin de récupérer le sang en vue de dosages hormonaux et différents organes du tractus reproducteur (ovaire mais aussi oviducte et chez l'adulte utérus et hypophyse). La croissance folliculaire est estimée à 3 et 6 jpn en double immunofluorescence (contre Pcn, marqueur de prolifération cellulaire et Fn (fibronectine) composant des membranes basales). Des marqueurs folliculaires de la première vague de croissance sont mis en évidence par HIS (Gdf9 : ovocytaire ; Inh, Amh, Actb et Cyp19a1 : somatiques) à 3 et 6 jpn. À 21 jpn et chez l'adulte, les ovocytes sont marqués à l'aide de Ybx2 (Msy2). La survenue de la puberté est surveillée par observation de l'ouverture vaginale. Dès que celle-ci est constatée, des frottis vaginaux sont réalisés afin d'établir le délai entre l'ouverture vaginale et le premier œstrus ainsi que la cyclicité des femelles jusqu'à 2 mois. Les capacités reproductives des femelles sont évaluées par mise en contact avec un mâle à la fertilité avérée (non traité, issu de l'élevage du laboratoire) durant 5 jours et 5 nuits consécutifs afin de couvrir un cycle estrien complet, et ce à l'âge de 2, 3 et 4 mois. Le dosage plasmatique des gonadotropines (LH et FSH) est réalisé par ELISA chez les animaux de 21 jpn et adultes. Le dosage des hormones ovariennes (E2, testostérone T et progestérone P4) chez les animaux de 21 jpn et adultes est réalisé par GC/MS-MS en collaboration avec Frank Giton (U955 – IMRB – Créteil).

3. RÉSULTATS

Influence du traitement sur l'animal immature.

Juste après la naissance a lieu chez le rat la formation folliculaire, processus permettant de passer du stade de cordons ovariens (amas de cellules germinales interconnectées bordé de quelques cellules somatiques et une membrane basale) aux follicules individualisés (composés d'une cellule germinale unique entourée de cellules de la pré-granulosa squameuses) entourés par la membrane basale (Hirshfield, 1992). Dès la fin de l'histogenèse folliculaire, alors que la majorité des follicules reste quiescente jusqu'à la puberté, certains follicules entrent en croissance (Hirshfield, 1992). Les cellules de la granulosa se multiplient, permettant l'expansion folliculaire. Nous avons choisi d'évaluer deux critères de la croissance folliculaire : la prolifération cellulaire et la différenciation. Les follicules primordiaux entrant en croissance ont une assise de cellules de la granulosa marquée par PCNA, marqueur de prolifération. Les cellules de la granulosa changent de forme, les cellules deviennent cubiques (stade primaire). À 3 jpn les ovaires témoins (fig.51 A, page 187) et traités (fig.51 B) contiennent des follicules primordiaux (ovocyte marqué par PCNA et membrane basale continue mise en évidence par la fibronectine) et primaires (cellules de la granulosa marquées par PCNA et entourée par la membrane basale). À 6 jpn les follicules en croissance sont en transition vers le stade secondaire, caractérisé par 2 assises de cellules de la granulosa (fig.51 C et D). Msy2, marqueur ovocytaire (fig.52 A et E) illustre l'abondance relative d'ovocytes.

Outre la prolifération, les cellules du follicule en croissance subissent également une différenciation mise en évidence par divers marqueurs connus pour intervenir dans la maturation folliculaire soit Gdf9, facteur de croissance ovocytaire agissant sur les cellules somatiques (Albertini *et al.*, 2001), Inha et Actba (Mather *et al.*, 1997), Amh (Durlinger *et al.*, 2002) et Cyp19a1 (aromatase, enzyme intervenant dans la synthèse des œstrogènes, Hickey *et al.*, 1988, Mazaud *et al.*, 2002). Les ovocytes des follicules croissants expriment Gdf9 à partir de 3 jpn (fig.52 B, F et I, M) quel que soit le traitement. Les cellules somatiques expriment Inha dès 3 jpn (fig. 52 C et G) et à 6 jpn (fig. 52 J et N), Amh dès 3 jpn (fig. 52 D et H), Actba dès 6 jpn (fig. 52 K et O) et Cyp19a1 (fig. 52 L). Ces données démontrent que les ovaires traités conservent leur capacité à initier la vague de croissance folliculaire précoce. L'état endocrine et ovarien de l'animal est évalué au début de la période juvénile (soit 21 jpn). Le poids de l'ovaire rapporté au poids corporel (fig. 53 A) est réduit chez les animaux traités et ce significativement dans le groupe d'animaux traités à forte dose. Les coupes histologiques d'ovaires révèlent des follicules (dont l'ovocyte est marqué par Msy2) quiescents (primordiaux) et des follicules en croissance jusqu'au stade antral chez le témoin (fig. 53 B) comme chez les animaux traités à la forte dose (fig. 53 C). Les hormones ovariennes œstradiol (fig. 53 D) et testostérone (fig. 53 E) ne sont pas statistiquement modifiées bien que l'œstradiol montre une tendance à la baisse à la dose forte et la testostérone semble réduite à la dose faible. Le poids de l'hypophyse (fig.53 F) n'est pas modifié, ni les hormones hypophysaires LH (fig. 53 G) et FSH (fig.53 H) à la dose forte. L'ovaire traité a donc poursuivi sa maturation et l'hypophyse ne présente pas de variation de poids liée au traitement.

La puberté

La puberté se manifeste chez les rongeurs femelles par l'ouverture vaginale qui survient normalement au lendemain de la première ovulation. L'œstrogénisation néonatale avance l'ouverture vaginale chez les animaux traités (significativement seulement à la dose faible) d'environ 2 jours (fig. 54 A). Le premier œstrus (fig. 55 B) survient en revanche à un âge similaire quel que soit le traitement, significativement plus tôt que chez les animaux témoins, soit à environ 38 jpn contre 41. Le délai entre ouverture vaginale et premier œstrus est donc réduit de façon dose-dépendante (fig. 54 C). Si le poids lors de l'ouverture vaginale est similaire entre les groupes « témoin » et « dose faible » (fig. 54 D), les femelles traitées à la dose forte sont significativement plus petites.

Modification des capacités reproductives par l'œstrogénisation néonatale

Nous avons suivi l'établissement des cycles œstriens dès l'ouverture vaginale afin d'évaluer les effets des traitements sur ce cycle (fig. 55 A). Alors que chez les animaux témoins et traités à faible dose, des cycles réguliers de 4 jours s'établissent rapidement, seul un tiers des femelles traitées à la dose forte est régulièrement cyclé. Les autres ont soit des cycles irréguliers soit un œstrus allongé ou permanent. Leurs capacités reproductives ont alors été évaluées à la période où elles sont maximales chez la ratte : entre 2 et 6 mois (Ishii *et al.*, 2012). Si la fécondabilité (le pourcentage de gestations obtenues après que les différents groupes de femelles aient passé 5 jours consécutifs avec un mâle jeune et fertile) semble plus élevée à 2 mois (accouplement 1, fig. 55 B) chez les femelles traitées

avec la dose forte d'E2, elle est drastiquement réduite dès 3 mois (accouplement 2). Contrairement au groupe témoin où la fécondabilité reste la même entre 3 et 4 mois, elle décline à 4 mois dans le groupe traité à faible dose. La fécondité (le nombre de petits par femelle, fig. 55 C) suit la même évolution, elle est significativement altérée par la forte dose d'E2 dès 4 mois (accouplement 3).

Dynamique folliculaire et contexte endocrine

La physiologie ovarienne est évaluée à 8 mois soit environ 3 mois avant la sénescence reproductive et le déclin physiologique des hormones (Nelson *et al.*, 1981). À cet âge, le poids ovarien rapporté au poids corporel (fig. 56 A) est significativement réduit chez les femelles traitées à la dose faible mais pas chez les femelles traitées à forte dose. Morphologiquement, les ovaires témoins (fig. 56 B) ont un aspect de « framboise », les nombreuses aspérités étant formées par les follicules en fin de croissance et les corps jaunes. Les ovaires issus de femelles traitées à faible dose (fig. 56 C) peuvent présenter une asymétrie entre ovaire droit et gauche et surtout des kystes liquidien de grande taille à paroi fine. Les ovaires issus de femelles traitées à la dose forte (fig. 56 D) sont de plus petite taille que les ovaires témoins. Histologiquement, les ovaires des femelles témoins (fig. 56 E) contiennent des follicules à tous les stades de développement depuis le stade primordial. Un marquage des ovocytes par Ybx2 (Msy2) facilite le comptage des follicules primordiaux. La présence de corps jaunes indique des ovulations récentes. Les ovaires issus des femelles ayant reçu la faible dose (fig. 56 F) présentent également des follicules à tout stade de développement et des corps jaunes. Dans les ovaires issus des femelles traitées avec la dose forte (fig. 56 G), il y a des follicules à tout stade de développement mais pas de corps jaune, signe d'un défaut d'ovulation. La distribution des follicules, répartis selon leur stade de développement, est présentée en fig. 56 H-O. A 8 mois le stock de follicules primordiaux est équivalent chez les animaux témoins et traités à la dose forte mais diminué à la dose faible. La tendance est la même pour les follicules primaires, secondaires et pré-antraux. En revanche le nombre de follicules antraux sains est significativement réduit aux deux doses d'œstradiol. Le nombre de follicules antraux atrétiques est très variable au sein du groupe témoin mais la proportion de follicules atrétiques parmi les follicules antraux augmente en fonction de la dose d'œstradiol (significativement à la dose forte). La proportion de follicules en croissance sains parmi les follicules totaux reste inchangée.

Parmi les hormones ovariennes, le taux plasmatique circulant d'E2 est augmenté après traitement par la faible dose (fig. 57 A) mais ne varie pas après traitement à la dose forte. La P4 en revanche ne varie pas significativement à faible dose mais est diminuée à forte dose (fig. 57 B). La testostérone ne varie pas à faible dose (fig. 57 C) mais présente une tendance non significative à la baisse à 10 µg E2 / jour. Le poids de l'hypophyse n'est pas modifié par l'œstrogénisation néonatale (fig. 57 D). Les variations de la FSH (fig. 57 E) par rapport au témoin ne sont pas significatives. En revanche, les femelles ayant la faible dose d'E2 ont en moyenne à 8 mois moins de FSH circulante que les femelles ayant reçu la forte dose. Les taux circulants de LH (fig. 57 F) ne varient pas significativement.

Effets du traitement sur d'autres organes du tractus

Le traitement à l'œstradiol peut influencer également le développement d'autres organes du tractus reproducteur. L'oviducte porte des récepteurs des œstrogènes dès la naissance (en particulier ER α , comme démontré en hybridation *in situ*, voir figure 2 article « *Systemic compensatory response to neonatal estradiol exposure does not prevent depletion of the oocyte pool in the rat* ») et l'utérus exprime également ER α à cette même période (Mowa & Iwanaga, 2000). À la naissance, l'oviducte est complètement lisse. À 3 jpn chez les témoins, il a commencé à s'enrouler (fig. 58 A), contrairement à celui des femelles traitées avec 10 μ g/jr d'E2 (fig. 58 B). À 21 jpn le poids de l'oviducte rapporté au poids corporel présente une tendance à la baisse de façon dose-dépendante (fig. 58 C). À l'âge adulte, la différence morphologique entre témoin (fig. 58 D) et traité à 10 μ g/jour (fig. 58 E) est invisible mais le poids est significativement réduit à la dose faible et augmenté à la dose forte (fig. 58 F). À 21 jpn le poids de l'utérus rapporté au poids corporel (fig. 59 A) diminue de façon dose-dépendante (significativement à forte dose). Ces disparités disparaissent à l'âge adulte (fig. 59 B).

4. DISCUSSION

Nos résultats montrent qu'en dépit du traitement néonatal avec des œstrogènes, l'ovaire poursuit sa maturation avec la mise en place des vagues de croissance folliculaire. À 21 jpn, bien que le poids de l'ovaire soit moindre chez les animaux traités à la dose forte, la maturation suit son cours avec la présence de toutes les catégories de follicules en développement. Le contexte endocrine ne semble pas modifié non plus. En revanche la puberté est avancée quelle que soit la dose d'œstradiol utilisée, comme le montre l'âge de survenue du premier œstrus. Les femelles traitées à forte dose présentent rapidement d'importantes altérations des capacités reproductives voire une infertilité secondaire à 4 mois. Bien que ça ne soit pas significatif, il semblerait que les capacités reproductives diminuent également à faible dose. Le phénotype ovarien observé à l'âge adulte est dérégulé de deux façons bien distinctes selon la dose d'E2 utilisée à la naissance. En effet, les ovaires traités à faible dose ont un stock folliculaire réduit, des kystes et une production d'œstradiol très importante, alors que les ovaires traités à forte dose sont de petite taille mais sans déplétion massive du stock folliculaire, leurs follicules antraux sont souvent atrétiques, ils sont dépourvus de corps jaune et leur production de progestérone est altérée. Les hormones hypophysaires ne varient pas significativement mais on observe à faible dose une légère augmentation du rapport LH/FSH et à forte dose une augmentation légère de la FSH.

Qualité de la première vague de croissance folliculaire

La dynamique de recrutement folliculaire varie avec l'exposition néonatale aux PEO : le BPA (Karavan & Pepling, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012b), DES (Karavan & Pepling, 2012; Kim *et al.*, 2009), EE (Karavan & Pepling, 2012) et E2 (Karavan & Pepling, 2012; Kezele & Skinner, 2003) ralentissent la transition du

stade primordial au stade primaire, voire du stade primaire au stade secondaire, affectant ainsi la dynamique de sortie de quiescence lors de l'initiation de la première vague de croissance. À 8 jpn, les ovaires de ratte traitées avec des parabènes contiennent plus de follicules primordiaux et moins de follicules primaires, indiquant là aussi une baisse de l'entrée en croissance (Ahn *et al.*, 2012). Toutefois, d'autres études (Rodriguez *et al.*, 2010, Chao *et al.*, 2012) rapportent au contraire une transition du stade primordial au stade primaire accélérée. Dans notre modèle, cette question n'a pas encore été étudiée quantitativement. Cependant si l'on se base sur le nombre moyen d'ovocytes à 3 jpn (Chalmey *et al.*, 2013) et le nombre moyen de follicules à 8 mois, on en tire le tableau suivant :

	Nombre d'ovocytes à 3 jpn	Nombre de follicules à 8 mois	% de follicules « utilisés »	Effet potentiel sur le recrutement
Témoin	1 874,3	980,4	47,7	-
E2 [0,1 µg/jour]	1 638,3	452,5	72,4	<i>Accélération</i>
E2 [10 µg/jour]	1 068,6	931,5	12,8	<i>Ralentissement</i>

Il se pourrait que la dynamique de recrutement dépende de la dose : une dose faible serait en faveur d'un recrutement accéléré tandis qu'une dose forte serait au contraire un facteur de quiescence et ce dès la première vague de croissance. Cette hypothèse est confortée par une étude rapportant que 10 µg d'EB pendant 4 jours induisent dans l'ovaire de ratte une inhibition de l'entrée en croissance folliculaire parallèlement à augmentation de l'expression d'Amh (Ikeda *et al.*, 2002), facteur de quiescence. Indépendamment de cette variation de dynamique de recrutement, la première vague de croissance semble qualitativement similaire dans tous les groupes : les cellules de la granulosa prolifèrent et se différencient, exprimant divers facteurs caractéristiques de la croissance folliculaire à cet âge, différente de celle de l'adulte. Compte tenu de cet aspect qualitatif et du fait qu'à l'âge adulte certaines femelles traitées soient cyclées et en mesure d'avoir des portées (au moins provisoirement), nous pouvons conclure que la première vague de croissance parvient à jouer son rôle dans la maturation des capacités endocrines de l'ovaire et par extension dans la maturation du dialogue entre l'ovaire et ses centres de contrôle (hypothalamus et hypophyse) (Guigon *et al.*, 2003b).

Animal immature à 21 jpn

À 21 jpn, les follicules poursuivent leur développement par vagues. L'état de la réserve folliculaire n'a pas encore été évalué quantitativement à cet âge au cours de cette étude. Toutefois des follicules à tout stade de croissance sont présents dans tous les ovaires, tant chez les animaux témoins que chez les traités, à l'exception des follicules pré-ovulatoires. En effet, tous les follicules qui se développent chez l'animal immature sont physiologiquement voués à l'atrésie pour cause d'environnement endocrine inadapté à leur survie (McGee *et al.*, 1998). Les follicules en développement assurent la production endocrine ovarienne. Nos résultats indiquent que la production d'œstradiol n'est pas perturbée à cet âge par l'œstrogénisation, malgré une tendance à la baisse chez les animaux traités à forte dose. Si l'on considère que l'entrée en croissance des follicules est ralentie chez ces animaux, ceci pourrait résulter d'une éventuelle baisse du nombre de follicules en croissance en mesure de produire des œstrogènes. En revanche la testostérone n'est pas diminuée chez ces animaux. La

production des œstrogènes et de la testostérone, appartenant tous deux à la classe des stéroïdes, dépend d'une seule chaîne de biosynthèse, les œstrogènes dérivant de la testostérone par aromatisation. Toutefois, si l'ovaire est le seul organe en mesure d'aromatiser la testostérone, il n'est pas le seul doté de la capacité d'en produire. En effet, les glandes surrénales possèdent également l'équipement enzymatique adapté (revue, Ojeda *et al.*, 1980). À l'inverse, la réduction de la testostérone circulante chez les animaux traités à faible dose pourrait résulter d'une augmentation de son aromatisation par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (ceci pourrait être testé par marquage de Cyp19a1, l'aromatase, sur des coupes d'ovaires). Les gonadotropines, d'origine hypophysaire, ne semblent pas modifiées par le traitement.

Modifications de la puberté et des capacités reproductives

De nombreux PEO ont fait la preuve de leur influence sur la puberté, tant chez les rongeurs (Nass *et al.*, 1984; Pinilla *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2003; Nikaido *et al.*, 2004) que chez les primates (Golub *et al.*, 2003) et même les humains (Roy *et al.*, 2009; Bandera *et al.*, 2011). Le critère de survenue de la puberté utilisé est l'ouverture vaginale. Cette ouverture vaginale est significativement avancée dans le cas des animaux traités à faible dose et de façon non significative à faible dose. Ces observations sont cohérentes avec les données antérieures, tant chez la ratte que chez la souris, après exposition à des PEO d'origine naturelle ou synthétique (Nass *et al.*, 1984 ; Lewis *et al.*, 2003 ; Nikaido *et al.*, 2005 ; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008). Le premier œstrus survient plus tôt, quel que soit la dose d'E2 administrée.

Une irrégularité des cycles estriens signe une anomalie dans le fonctionnement de l'axe HHG. Or la dose forte d'œstradiol induit une irrégularité statistiquement significative. Ceci est cohérent avec des observations antérieures là encore après exposition néonatale à des PEO d'origine naturelle ou synthétique (Nass *et al.*, 1984; Kubo *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003 ; Bateman & Patisaul, 2008). Par ailleurs, si lors du premier accouplement la fécondabilité des femelles traitées à forte dose est équivalente à celle des femelles témoins, son rapide déclin suggère que la fonctionnalité de l'axe HHG se détériore très rapidement. Là encore, subfertilité et infertilité sont fréquemment rapportées après exposition néonatale à des PEO (McLachlan *et al.*, 1982; Newbold *et al.*, 1998; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008). À faible dose, bien qu'on n'observe pas de détérioration aussi brutale des capacités reproductives, la fécondabilité des femelles tend à baisser entre 3 et 4 mois, contrairement aux femelles témoins, suggérant tout de même une atteinte progressive -bien que plus tardive qu'à forte dose- de la fonction de reproduction. La fécondité suit une évolution similaire.

Responsabilité ovarienne et centrale dans la divergence phénotypique observée selon la dose

L'ovaire à l'âge adulte présente un phénotype différent pour chaque dose d'œstrogènes utilisée. Si l'ovaire témoin est fonctionnel, l'ovaire traité à faible dose présente des anomalies morphologiques (kystes et asymétrie fréquents) et des signes d'épuisement précoce du stock de follicules (proportion de follicules primordiaux réduite, ainsi que toutes les catégories de follicules en croissance). Il est cependant encore fonctionnel, comme l'atteste la présence de corps jaunes (synonymes d'ovulation

récente), la production d'hormones ovariennes et la sécrétion d'hormones hypophysaires similaires au témoin adéquates pour maintenir l'axe HHG fonctionnel. Ceci suggère les prémices d'une insuffisance ovarienne précoce. Toutefois le profil hormonal encore peu modifié (à l'exception de l'E2, anormalement élevé) est un argument en faveur d'une sénescence débutante. Cette augmentation de l'œstradiol a déjà été rapportée dans le cadre d'une étude sur l'influence d'un traitement anti-androgénique périnatale chez la truie (Grzesiak *et al.*, 2012). Ce traitement induisait une élévation du taux d'E2 circulant chez l'adulte causée par une sur-expression des récepteurs à la FSH et de l'aromatase. Une élévation du taux d'E2 a également été rapportée dans une étude dont le but était de déterminer la fenêtre de sensibilité maximale de l'ovaire aux œstrogènes, induisant un syndrome polykystique (Cruz *et al.*, 2012). Dans cette étude, des rattes exposées à de l'EV à 7 jpn ont une puberté avancée et des ovaires polykystiques à l'âge de 180 jpn. Cependant le stock folliculaire n'est pas affecté et l'origine de l'augmentation du taux circulant d'E2 n'a pas été élucidée et l'expression du récepteur de la FSH ou de l'aromatase n'a pas été testée. Les auteurs concluent toutefois à la validité du modèle d'œstrogénisation précoce pour l'étude de la survenue d'ovaires polykystiques. Dans notre modèle de rattes exposées à de l'E2 0.1 µg/jour à la naissance, bien que la présence de kystes soit évidente, l'épuisement folliculaire évoque plutôt une sénescence reproductive précoce trouvant son origine dans l'ovaire et sa dynamique de recrutement folliculaire accélérée. Cette accélération reste pour l'instant inexpliquée en l'absence d'effets évidents observés dans l'hypothalamus à cette dose (Navarro *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'étudier les facteurs impliqués dans les régulations de l'axe HHG et la sortie de quiescence folliculaire, tels que le taux d'Inhibine ou l'Amh, ainsi que la réceptivité ovarienne à la FSH et l'expression de l'aromatase.

Le tableau clinique des rattes traitées avec de l'E2 10 µg/jour est très différent. Le stock folliculaire est similaire à celui des témoins à 8 mois alors qu'il était largement réduit à 3 jpn (article 1). Les follicules en développement deviennent en grande partie atrétiques et n'aboutissent pas à l'ovulation, comme le démontrent l'absence quasi-totale de corps jaunes et l'effondrement de la progestérone. L'absence d'ovulation alors même que des follicules se développent au sein de l'ovaire suggère une atteinte centrale de l'axe HHG. Bien que les taux circulants de gonadotropines ne soient pas modifiés de façon significative, il semble que la FSH augmente légèrement, comme dans le cadre de la sénescence reproductive qui s'établit normalement vers 11 mois (Nelson *et al.*, 1981). Il est à noter que certaines femelles présentaient un œstrus permanent, soit un état annonciateur de l'état définitif d'anœstrus survenant en fin de vie reproductive, dès 3 mois. Ceci plaide également en faveur de l'entrée en « ménopause » de ces femelles traitées à forte dose. Toutefois la faiblesse des effectifs, la grande variabilité interindividuelle et l'absence de synchronisation des sacrifices des animaux au moment de l'œstrus ne permettent pas de statuer sur ce point avec certitude sur cette simple base. Il convient cependant de rappeler que l'atteinte de l'hypothalamus a déjà été rapportée suite à l'exposition néonatale de rattes à une dose similaire d'œstrogène (Losa *et al.*, 2011 ; Navarro *et al.*, 2009). Il est donc probable que la sénescence reproductive observée avec ce modèle dose forte trouve plutôt son origine dans le déclin de la fonction centrale de l'axe HHG et affecte déjà la totalité du tractus reproducteur.

L'E2 affecte d'autres organes du tractus

Si l'hypothalamus et l'ovaire sont des cibles dont le développement et la fonction sont modifiés par une œstrogénisation néonatale, deux autres organes le sont également : l'oviducte et l'utérus. À 3 jpn, la morphologie anormalement lisse de l'oviducte traité à 10 µg/jour suggère que l'E2 maintient cet organe dans un état d'immaturité. Cette immaturité persistante a déjà été observée sur l'ovaire (les œstrogènes inhibent la fragmentation des cordons ovariens ; Kipp *et al.*, 2007, Losa *et al.*, 2011, Rodriguez *et al.*, 2010) et sur le foie (le traitement retarde la maturation de l'expression de certaines enzymes, article 1). Ces données suggèrent que le développement de l'oviducte est lui aussi lié à la levée de l'imprégnation hormonale (et particulièrement œstrogénique) maternelle au moment de la naissance et sont cohérentes avec des études antérieures sur l'E2 (Okada *et al.*, 2004) et le DES (Newbold *et al.*, 1983). Le DES induit d'ailleurs chez la souris un maintien de l'oviducte dans une position fœtale ou néonatale autour de l'ovaire, alors que chez l'adulte normal, l'oviducte s'enroule sur lui-même entre l'ovaire et l'utérus. Cet enroulement est similaire à celui de l'épididyme chez le mâle. Chez ce dernier, ce phénomène est sous la dépendance de l'inhibine (Tomaszewski *et al.*, 2007). Il est donc envisageable de vérifier d'éventuelles variations du taux d'inhibine dans notre modèle. Dans le cas présent, ces effets s'estompent transitoirement puisque l'oviducte à 21 jpn ne présente pas de variation de poids par rapport au témoin, ni d'altération morphologique évidente. Mais à l'âge adulte le poids de l'oviducte est réduit à faible dose et augmenté à forte dose. Cet organe subit donc lui aussi une « empreinte œstrogénique » persistante.

L'utérus semble lui aussi affecté par l'œstrogénisation néonatale. Son poids chez l'animal de 21 jpn décroît avec la dose d'E2 administrée. Ceci avait déjà été rapporté, notamment après une exposition néonatale à du DES ou de l'EE (Branham *et al.*, 1988). Dans cette étude l'épaisseur de l'épithélium luminal utérin est corrélée au poids de l'utérus et inversement corrélée à la dose d'œstrogène administrée. Une étude histologique de l'utérus (tissus déjà disponibles) permettrait de vérifier ce paramètre dans le cadre de notre propre étude.

FIGURES :

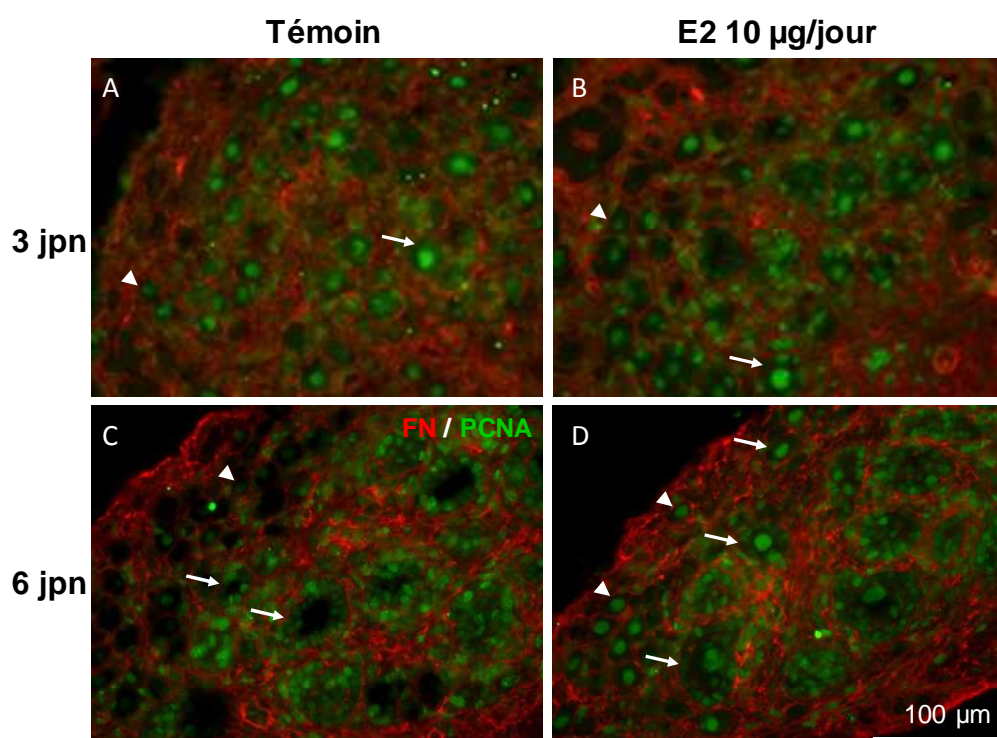


Figure 51 : Prolifération cellulaire dans l’ovaire à 3 et 6 jpn

Des coupes d’ovaires de 3 jpn (**A, B**) et 6 jpn (**C, D**) non traités (**A, C**) ou traités avec 10 µg d’E2 par jour entre la naissance et 2 jpn (**B, D**) sont marquées par immunohistochimie contre la fibronectine (rouge, composant des membranes basales) et PcnA (proliferative cell nuclear antigen, vert). Les ovaires présentent tous des follicules primordiaux (pointe de flèche) et des follicules en croissance (flèche) dont les cellules de la granulosa prolifèrent.

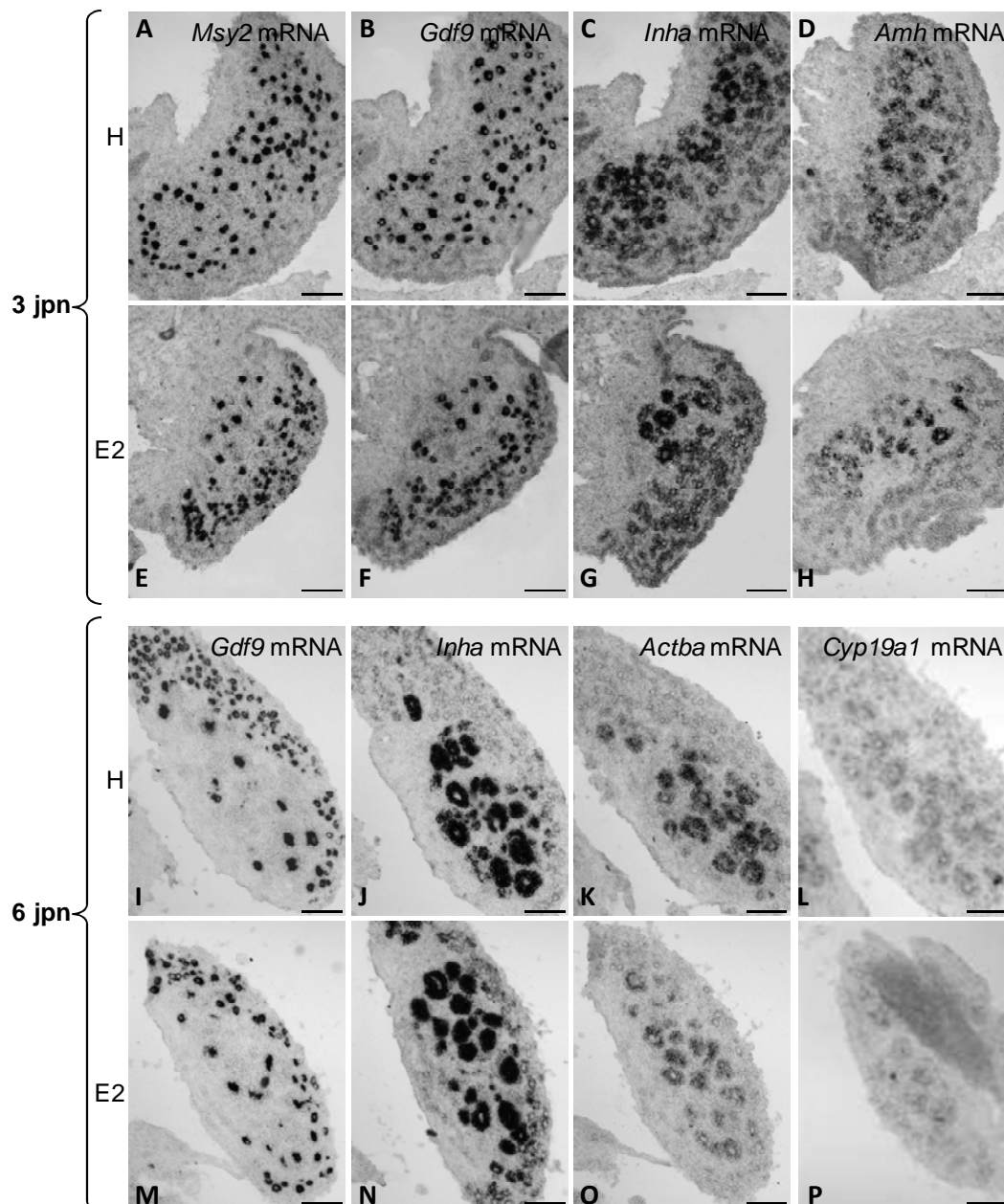


Figure 52 : Vague de croissance à 3 et 6 jpn

Hybridation *in situ* de coupes d'ovaires de 3 jpn (A-H) et 6 jpn (I-P) non traités (A-D; I-L) ou traités avec 10 µg d'E2 par jour entre la naissance et 2 jpn (M-O). Les sondes utilisées sont caractéristiques des ovocytes (Msy2-A, E), des ovocytes appartenant à des follicules en croissance (Gdf9-B,F, I, M) ou des cellules de la granulosa des follicules en croissance (Inha-C, G, J, N; Amh-D, H ; Actba-K,O ; Cyp19a1 (aromatase)-L,P). A 3 comme à 6 jpn, les ovaires traités et témoins expriment les différents marqueurs de croissance et différenciation.

Barre d'échelle : 100 µm

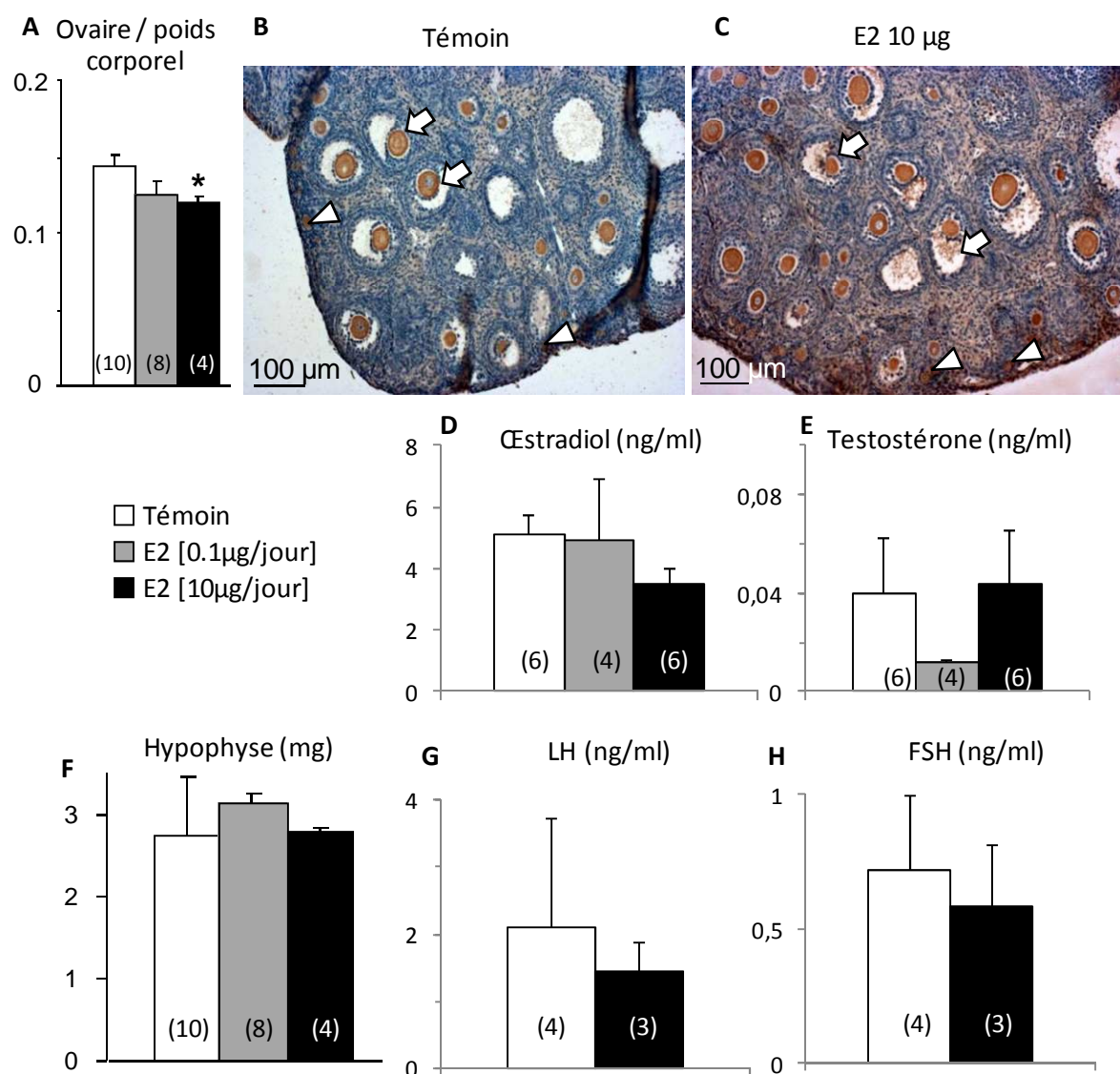


Figure 53 : Morphologie ovarienne et contexte endocrine à 21 jpn.

A : Le ratio poids de l'ovaire rapporté au poids corporel tend à diminuer en fonction de la dose d'E2 injectée. Cette diminution n'est significative qu'à forte dose. Des coupes histologiques (**B**, **C**) des ovaires marquées à l'aide Msy2, marqueur ovocytaire, montrent des follicules à tous les stades de développement, du stade primordial (point de flèche) au stade antral (flèche) à la fois chez le témoin (**B**) et le traité à 10 µg/jour (**C**). Les stéroïdes circulants à cet âge (**D**: E2 et **E**: Testostérone) évalués par GC/MS-MS ne varient pas significativement avec la dose. Le poids de l'hypophyse (**F**) n'est pas modifié par le traitement, ni les taux circulants d'hormones hypophysaires dosées par ELISA (**G**: LH et **H**: FSH).

Valeurs présentées = moyennes ± SEM. Effectifs : (n). Test : Kruskal-Wallis * : $p < 0.05$

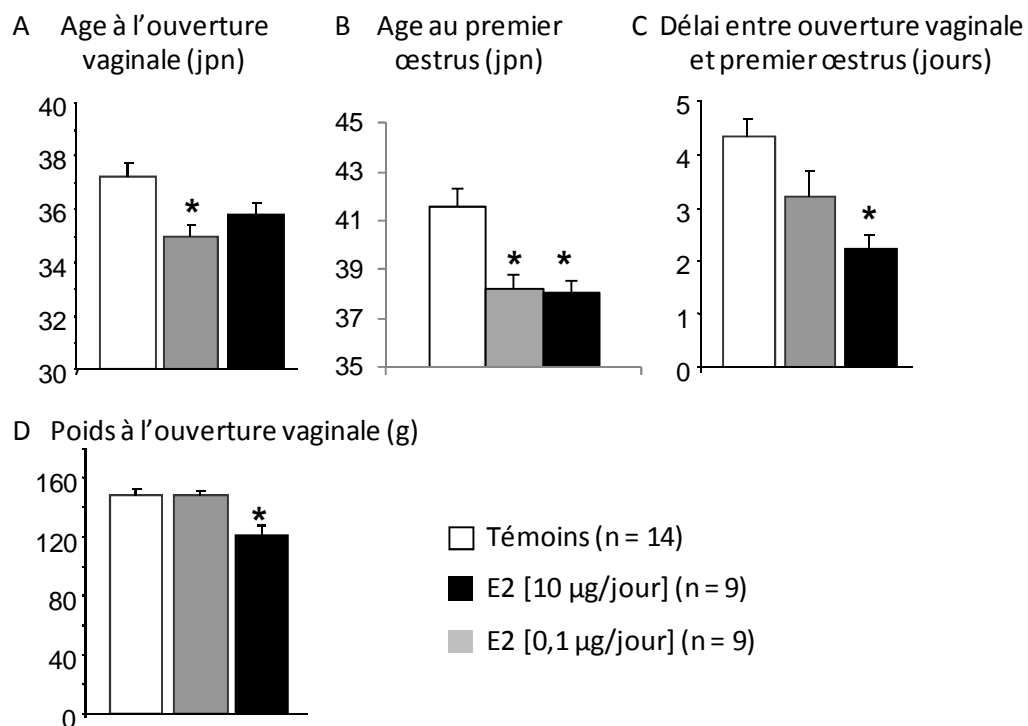


Figure 54 : Survenue de la puberté après traitement néonatal à l'E2.

A: le traitement à l'E2 réduit l'âge de l'ouverture vaginale (significativement à la dose faible). Le premier œstrus (constaté par frottis vaginaux quotidiens) survient plus tôt chez les femelles traitées (**B**). Le délai entre l'ouverture vaginale et le premier œstrus est plus court chez les femelles traitées à forte dose (**C**). Le poids corporel lors de l'ouverture vaginale (**D**), similaire entre le groupe témoin et le groupe traité à faible dose, est significativement plus bas dans le groupe traité à forte dose.

Valeurs présentées = moyennes \pm SEM. Test : Kruskal-Wallis * : $p < 0.05$

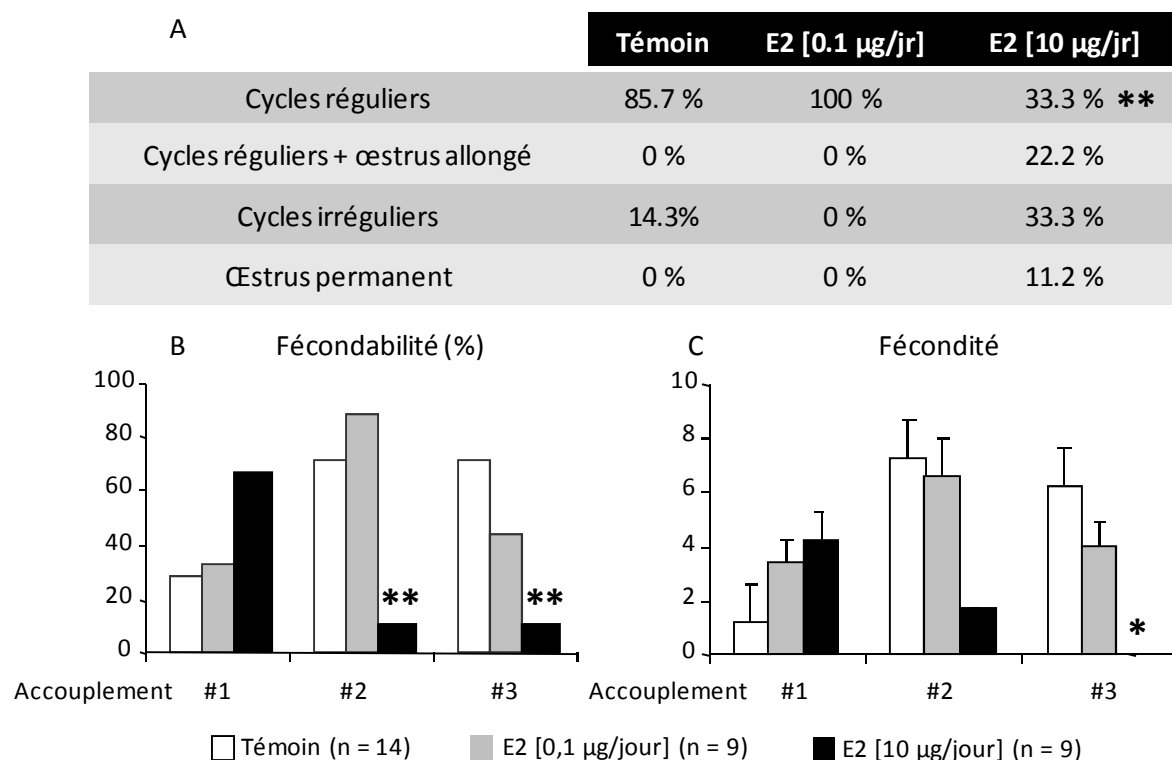


Figure 55: Santé reproductive de la femelle adulte après traitement néonatal à l'E2

La cyclicité des femelles adultes (**A**) est évaluée par frottis vaginaux quotidiens. Dans le groupe témoin, les femelles ont en majorité des cycles réguliers d'une durée de 4 jours, comme les animaux ayant reçu la faible dose. Dans le groupe traité à la forte dose, la proportion de femelles régulièrement cyclée est significativement réduite. Les animaux peuvent présenter des cycles irréguliers ou un œstrus allongé voire permanent. La fécondabilité (**B**) des femelles traitées n'est pas altérée lors du premier accouplement. Dès le 2^{ème}, la fécondabilité dans le groupe traité à forte dose diminue significativement. La fécondité (**C**) est également significativement réduit par la forte dose.

Valeurs présentées = pourcentage ou moyennes \pm SEM.

Tests : Fisher exact, Kruskal-Wallis et Dunn * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

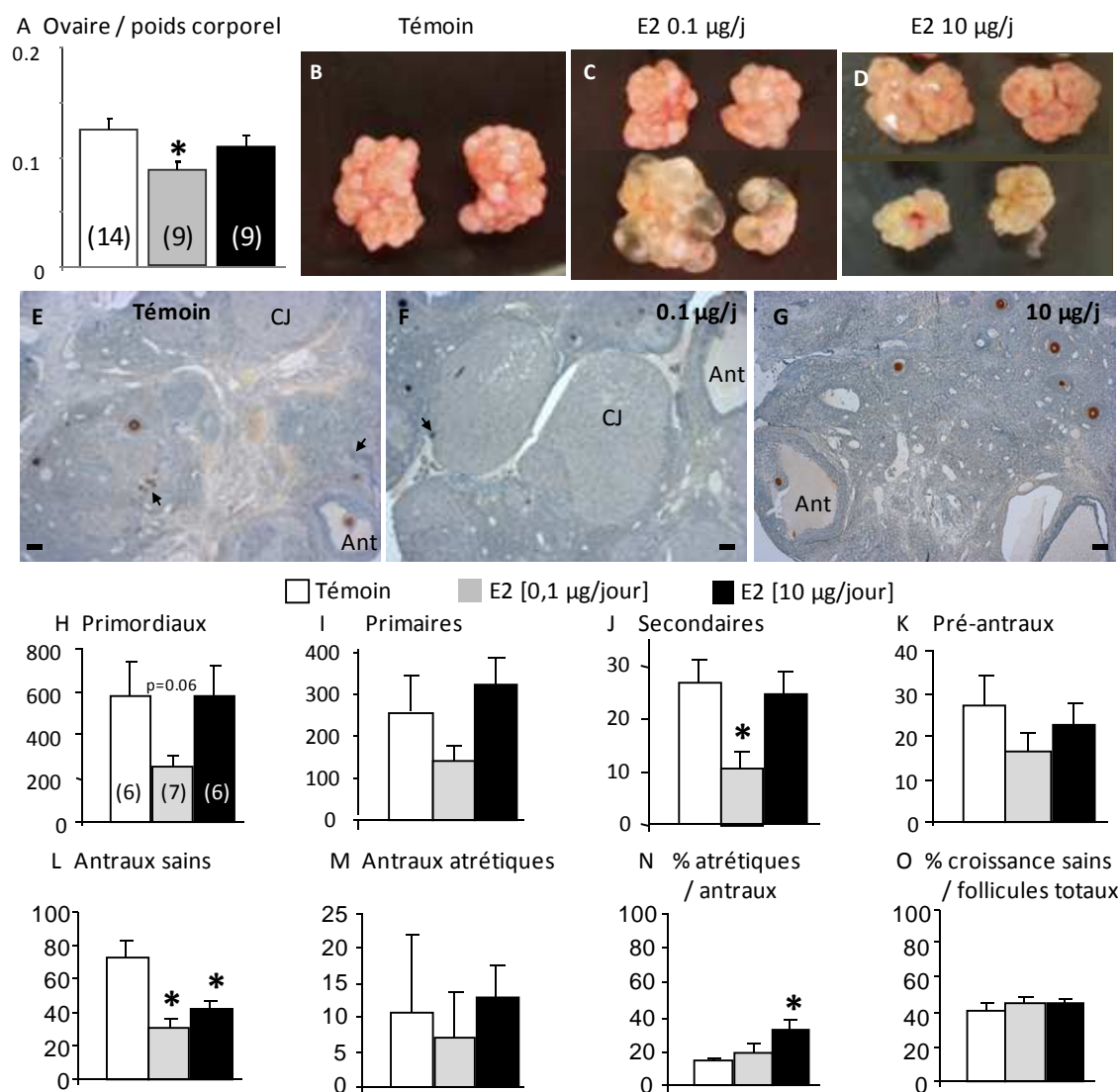


Figure 56 : Phénotypes ovariens observés à l'âge adulte après traitement néonatal à l'E2.

A : Ratio du poids de l'ovaire rapporté au poids corporel. La dose faible induit une baisse significative. **B-D** : Morphologie ovarienne. Les ovaires témoins (**B**) portent de nombreux grands follicules et des corps jaunes. Les ovaires traités à faible dose (**C**) présentent parfois une asymétrie et des kystes liquidiens. Les ovaires traités à forte dose (**D**) ont un volume réduit. **E-G** : Coupes histologiques d'ovaires à l'âge adulte selon le traitement. Les ovocytes sont marqués à l'aide de Msy2 (Ybx). Tous présentent des follicules entre les stades « primordial » (flèche) et « antral » (Ant). Les témoins (**E**) et traités à faible dose comportent des corps jaunes (CJ). Les ovaires traités à la dose forte (**G**) n'en ont pas. **H-O** : Comptage des follicules dans l'ovaire adulte selon le traitement. A la dose forte, aucune catégorie de follicules n'est modifiée entre le stade primordial et le stade pré-antral. A la dose faible toutes ces catégories sont réduites (catégorie « secondaires » significativement réduite **J**). Les antraux sains sont moins nombreux quelle que soit la dose (**L**) et la proportion d'atrétiques est plus élevée à la dose forte (**N**). La proportion de follicules en croissance sains parmi les follicules totaux est inchangée.

Valeurs présentées = moyennes ± SEM. Effectifs : (n). Test : Kruskal-Wallis * : p<0.05

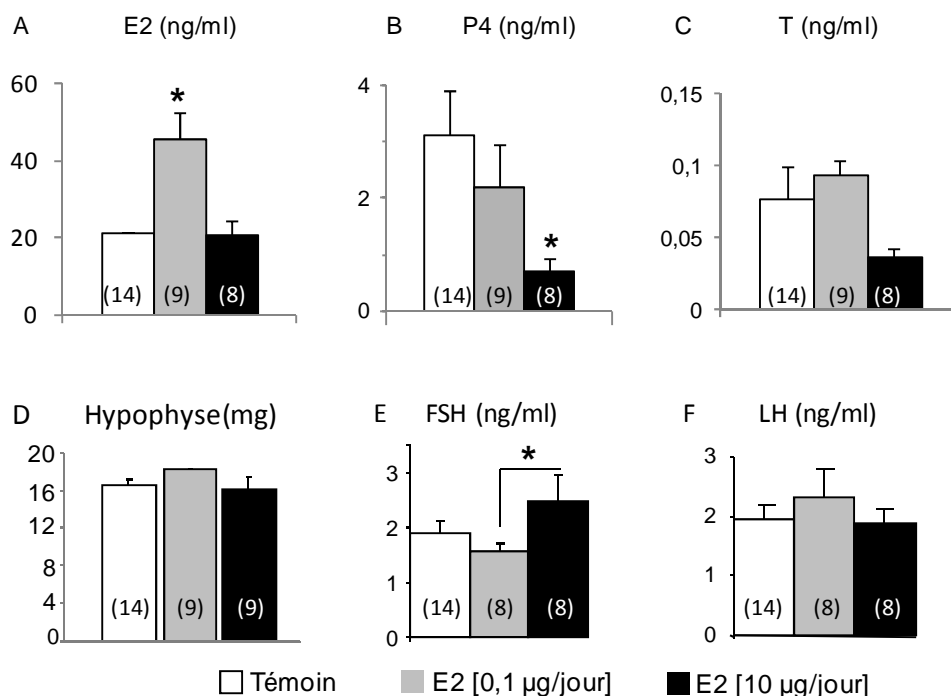


Figure 57 : Contexte endocrine chez la femelle adulte traitée à l'E2 en période néonatale. Les hormones sont dosées dans le sang par GC/MS-MS (A-C) ou par ELISA (E,F). L'E2 (A) est significativement augmenté à faible dose et la P4 (B) réduite à forte dose. La testostérone (C) ne varie pas significativement. Le poids de l'hypophyse (D) ne varie pas. La FSH (E) ne varie pas significativement par rapport au témoin mais le taux circulant à forte dose est supérieur au taux circulant à faible dose. La LH (F) ne varie pas significativement. Valeurs présentées = moyennes \pm SEM. Effectifs : (n). Test : Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, * : $p < 0.05$

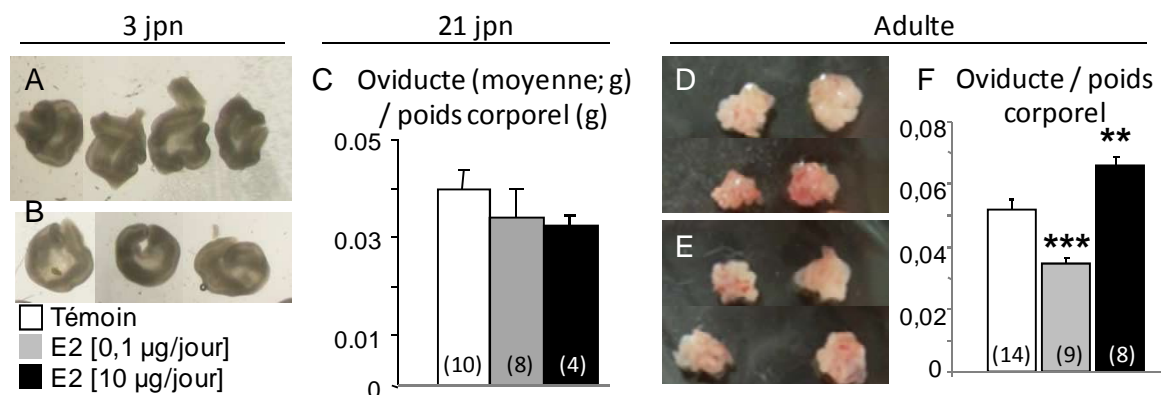


Figure 58 : Oviductes issus d'animaux témoins ou traités pendant 3 jours avec de l'E2.

À 3 jpn (A,B): chez les témoins (A), l'oviducte prend un aspect enroulé. Chez les animaux traités avec 10 µg/jour (B), l'oviducte reste lisse. À 21 jpn (C) le poids de l'oviducte ne présente pas de variation significative en fonction du traitement. À l'âge adulte (D,E) la morphologie de l'oviducte chez les animaux témoins (D) et traités à 10 µg/jour (E). Le poids de l'oviducte (F) est significativement diminué à faible dose mais augmenté à forte dose.

Valeurs présentées = moyennes ± SEM. Effectifs :(n). * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001



Figure 59 : Utérus issus d'animaux témoins ou traités pendant 3 jours avec de l'E2 10 µg/jr et prélevés à 21 jpn (A) et à l'âge adulte (B). Chez l'animal immature, l'utérus a un poids réduit.

Valeurs présentées = moyennes ± SEM. Effectifs :(n).

Test : Kruskal-Wallis * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001

III. Exposition néonatale aux œstrogènes et altérations génétiques et génomiques

1. INTRODUCTION

La période périnatale est extrêmement importante pour le développement de l'ovaire de rongeur. Les cellules germinales qu'il contient ont d'abord subi des mitoses synchronisées dont la cytokinèse était incomplète, laissant les cellules germinales interconnectées par des ponts cytoplasmiques (Pepling & Spradling, 1998). Ces amas de cellules germinales sont entourés par des cellules somatiques squameuses et bordés par une membrane basale, formant les cordons ovariens (Byskov & Lintern-Moore, 1973; Jeppesen, 1977; Merchant-Larios & Chimal-Monroy, 1989). Les cellules germinales entrent en méiose à 17.5 jpc (Beaumont & Mandl, 1962), processus au cours duquel la cellule subit deux cycles de division, passant de l'état diploïde à l'état haploïde. Le début de la méiose, la prophase, est extrêmement long et se subdivise en plusieurs stades caractérisés par les événements génétiques qui s'y déroulent. Ainsi, lors du stade leptotène, les chromosomes s'alignent par paire et Spo11 induit physiologiquement des cassures double brins dans l'ADN (Keeney *et al.*, 1997). Au stade zygotène, les premières protéines de réparation des cassures sont recrutées, notamment H2AX (Rogakou *et al.*, 1998), qui permet le recrutement de la cohésine essentielle à l'établissement des complexes synaptonémaux (Lowndes & Toh, 2005). Une cascade de recrutement protéique se met en place (pour revue, Roeder, 1997) dont le but est de réparer les cassures tout en procédant à des recombinaisons de chromatine. Au stade pachytène, indépendamment du déroulement de la méiose, survient la naissance de l'animal (Beaumont & Mandl, 1962). La réparation de l'ADN est alors presque terminée et la cellule vérifie l'intégrité de son matériel génétique (pour revue, Roeder, 1997). Les mécanismes de vérification impliquent des complexes protéiques « détecteurs » recrutant des complexes « médiateurs » qui induisent à leur tour l'action de différents « effecteurs » bloquant le cycle cellulaire et réparant les lésions. Ils sont mis en place suite aux dommages à l'ADN induits volontairement lors de la méiose mais aussi afin de réparer les atteintes de l'ADN d'origine externe (Lydall *et al.*, 1996; Bartek & Lukas, 2007; Paull *et al.*, 2000; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Si les dommages sont trop importants, la cellule entre en apoptose (Bartek & Lukas, 2007; Ciccia & Elledge, 2010). Si l'état de l'ADN est satisfaisant, la méiose se poursuit, passant au stade diplotène.

Rapidement après la naissance les cordons ovariens se fragmentent pour former les follicules ovariens, formés d'une cellule germinale entourée d'une assise de cellules de la granulosa et bordée d'une membrane basale (Merchant-Larios & Chimal-Monroy, 1989). La fragmentation de ces cordons fait intervenir une vague de mort ovocytaire physiologique (Pepling & Spradling, 2001), un remodelage de la membrane basale (Rajah *et al.*, 1992; Mazaud *et al.*, 2005). Elle est en partie conditionnée par le dialogue entre les cellules germinales et les cellules de la granulosa, notamment par la voie des Pi3K (Phosphatidyl-inositol 3 kinase, Wang & Roy, 2004). Elle est aussi liée à l'avancement méiotique des cellules germinales. Ainsi, chez les souris dont certains gènes de réparation de l'ADN ont été invalidés (Atm, Dmc1, Msh5), les ovocytes entrent en apoptose avant la

formation des follicules mais ces animaux ont une formation folliculaire normale si l'induction des cassures de l'ADN est inhibée (Barlow *et al.*, 1998 ; Di Giacomo *et al.*, 2005). L'invalidation de Scp1 (impliqué dans la formation des complexes synaptonémaux) entraîne un passage précipité au stade diplotène, autorisant alors la formation des follicules (Paredes *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette formation folliculaire dépend aussi de facteurs endocrines et notamment des œstrogènes. Au moment de la naissance, l'animal s'affranchit des hormones maternelles auxquelles il était soumis *in utero* et cette levée d'imprégnation est un facteur permissif pour la fragmentation des cordons ovariens et la formation des follicules (Kezele & Skinner, 2003 ; Chen *et al.*, 2007b). L'absence de levée d'imprégnation maternelle induit des perturbations de la formation folliculaire, notamment en réduisant le nombre de cellules germinales chez la ratte (Kipp *et al.*, 2007 ; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2008 ; Sotomayor-Zarate *et al.*, 2011). D'autre part, 3 jours d'exposition à une dose de 10 µg/jour d'E2 entre la naissance et 2 jpn induisent la réduction de 30 % des ovocytes à 3 jpn mais une dose 100 fois plus faible n'a pas d'influence sur la survie de ces cellules (Chalmey *et al.*, 2013). La qualité et la quantité de cellules germinales à cet âge précoce sont primordiales car le stock de follicules n'est pas renouvelable (Zuckerman, 1951). À la fin de la période de formation folliculaire, le stock définitif ainsi formé conditionnera les capacités reproductives de l'adulte.

Nous avons choisi d'étudier les conséquences très précoces de deux doses de 17β-œstradiol : 10 µg/jour, dose de référence induisant une déplétion de 30 % du nombre de cellules germinales à 3 jpn et une infertilité secondaire à 4 mois et 0.1 µg/jour, dose n'altérant pas la survie cellulaire à 3 jpn mais induisant une déplétion massive et précoce du stock folliculaire à 8 mois (voir parties précédentes). Cette étude a donc pour but de déterminer si un traitement précoce aux œstrogènes le premier jour de vie, soit pendant la méiose et la formation des follicules, induit des dérégulations du transcriptome ovarien. La seconde partie de l'étude tentera de déterminer si l'apoptose des cellules germinales à forte dose peut être liée à des dommages de l'ADN induits par les œstrogènes, substance aux propriétés génotoxiques connues (pour revue, Liehr, 2000).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les différentes techniques utilisées ont été détaillées dans la section « Matériel et Méthodes » de ce manuscrit.

Les animaux sont issus de l'élevage du laboratoire ou de l'élevage industriel Janvier (Le Genest St Isle, 53). À la naissance, les rattes nouveau-nées sont réparties en 3 groupes recevant une injection sous-cutanée unique à 4 heures post-natale. Le premier groupe reçoit 1 injection d'huile de maïs (témoin), le second reçoit 1 injection de 0.1 µg/jr de 17β-œstradiol (E2) et le dernier 1 injection de 10 µg/jr de E2. Dans chaque groupe, une partie des animaux est sacrifiée à 24 heures post-natales, les ovaires sont prélevés, séparés en deux pools contenant les ovaires de 5 à 12 animaux chacun et congelés à -80°C en vue de la préparation des microarrays. Une autre partie est sacrifiée 2 heures

après l'injection pour un premier test des comètes (4 animaux par dose). La dernière partie est sacrifiée à 24 heures pour le second test des comètes (5 animaux par dose).

Les microarrays sont réalisées avec des ADNc (issus de la rétrotranscription des ARN d'ovaire puis de leurs fragmentation et marquage avec un fluorochrome) hybridés sur des puces Affymetrix GeneChip Rat Gene 1.0 ST array (#901173) permettant une étude prospective du transcriptome ovarien. L'analyse bioinformatique est réalisée à l'aide du logiciel AMEN. La validité des données est vérifiée par contrôle interne via des sondes tests intégrées à la puce. Ces sondes permettent la normalisation du signal, dont la moyenne est faite sur chaque réplicat. Chaque puce porte un total de 18 785 gènes représentés par 26 212 transcrits. La limite de détection du signal est fixée au 25^{ème} percentile de l'intensité du signal global. Ceci permet de considérer les gènes et transcrits dont le signal est en dessous de ce seuil comme non exprimés et les élimine de l'analyse. Les conditions de traitement sont analysées 2 à 2. Au sein de chaque comparaison, seuls les gènes et transcrits présentant un facteur de variation d'expression supérieur à 1.5 sont conservés et soumis à un test statistique (SAM) (Tusher *et al.*, 2001). Les validations ont été réalisées en qPCR sur les mêmes ARN que ceux utilisés pour les puces ainsi que sur des pools supplémentaires (2 pools supplémentaires d'au moins 5 animaux par dose) afin de réduire les effets de la variabilité interindividuelle. Les validations en HIS ont été réalisées sur des cryocoupes d'organes fixés avec du paraformaldéhyde 2 % et marqués à l'aide de sondes préparées au laboratoire.

Les tests des comètes ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Ces tests incluent une dose supplémentaire (1 µg) intermédiaire entre la dose faible (0.1 µg) et la dose forte (10 µg) afin d'évaluer la linéarité de la réponse observée en fonction de la dose. Un témoin positif (MMS) a également été inclus au temps court pour s'assurer, le cas échéant, que l'absence d'effet constaté était due à l'absence d'effet du traitement et non à une évaluation trop précoce de la réponse à l'E2.

3. RÉSULTATS

Le transcriptome ovarien néonatal sous l'influence de l'E2

Les puces à ADN sont un outil prospectif donnant une vue générale des dérégulations du transcriptome à un instant donné sans a priori sur le type de réponse mis en place par l'organe. Elles ont été réalisées sur des ovaires totaux de 1 jpn issus d'animaux traités à 4 heures post-natales. L'analyse des données, réalisée à l'aide du logiciel AMEN (Chalmel & Primig, 2008), (figure 60) commence par la vérification de la validité technique de chaque puce grâce à des contrôles internes qui permettent la normalisation du signal émis par la puce (fig. 60 A, page 208) afin de pouvoir comparer les puces. Les puces sont réalisées en duplicats, c'est donc la moyenne des signaux qui est utilisée pour l'analyse des données elle-même (fig. 60 B). Les comparaisons entre les différentes puces sont d'abord réalisées deux à deux (témoin / dose faible ; témoin / dose forte ; dose faible / dose forte). Ne sont conservés que les gènes qui présentent un facteur de variation d'expression selon le traitement (*fold change*) d'au moins 1.5. Ils sont ensuite soumis à un test statistique (SAM, Significance Analysis of Microarrays) dont le seuil de significativité est fixé à 0.05.

Finalement, 131 transcrits (correspondant à 91 gènes) sont significativement modifiés par le traitement à l'E2. La cartographie colorimétrique (fig. 61) offre une représentation visuelle du niveau d'expression de chacun des 131 transcrits sélectionnés en fonction de leur condition de traitement. Parmi eux, certains ne sont pas annotés : leur correspondance avec un gène connu n'est pas établie par le système Affymetrix utilisé. Les 6 puces utilisées (2 par dose) sont représentées en colonnes. Les différents transcrits différentiellement exprimés en fonction de la dose sont groupés en profils-types. Le profil 1 (P1) correspond aux gènes dont l'expression augmente à la faible dose et plus encore à forte dose (par rapport au témoin), il s'agit d'une réponse dose-dépendante classique. Le profil 2 (P2) rassemble les gènes dont l'expression est identique quelle que soit la dose d'œstradiol mais supérieure à l'expression chez le témoin. Le P3 concerne les gènes dont l'expression est similaire dans les groupes « témoin » et faible dose mais augmentée à forte dose. Le P4 regroupe les gènes dont l'expression est augmentée à faible dose et un peu moins à forte dose. Ces 4 profils rassemblent donc tous les gènes dont l'expression augmente par rapport au témoin avec l'une et/ou l'autre des doses d'œstradiol testées (« *increased* »). C'est le cas par exemple de Dpp6 ou EdnrB (P1), Ncam2 (P2), Isyna1 (P3) ou Sgk1 (P4). Le profil 5 (P5) regroupe les gènes dont l'expression n'est pas modifiée à la dose faible mais réduite à la dose forte, par exemple Afp. Le P6 rassemble les transcrits dont l'expression est réduite à faible comme à forte dose. Ce groupe ne contient que des transcrits non annotés. Au sein des profils P5 et P6, l'expression des gènes est réduite par rapport au témoin, à faible ou à forte dose (« *decreased* »). Le profil 7 concerne les transcrits dont l'expression est diminuée à faible dose mais augmentée à forte dose. Sur 8 transcrits appartenant à ce groupe, seuls 3 correspondent à des gènes annotés (Htr2a, Tmem92, Gabrg1). Le dernier profil (P8) rassemble les gènes dont l'expression est augmentée à faible dose mais réduite à forte dose. Les profils 7 et 8 comprennent donc les gènes sur l'expression desquels E2 a une action inverse en fonction de la dose (« *opposite* »). Les profils P3 et P5 correspondent à la réponse spécifique de la dose forte. Aucun profil ne révèle une expression similaire chez le témoin et la dose forte, isolant un profil spécifique de la dose faible.

L'intégration au cours de l'analyse fonctionnelle des informations disponibles dans les banques de données en ligne (Gene Ontology : <http://www.geneontology.org/>, Comparative Toxicogenomic Database : <http://ctdbase.org>, Gene Expression Omnibus : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a mis en évidence des enrichissements (fig. 62). On parle d'enrichissement quand, pour une fonction donnée, le nombre de gènes dont l'expression est modifiée est plus important que s'ils étaient choisis au hasard. Par exemple, dans le groupe « increased », pour le processus biologique « apprentissage et mémoire », 7 gènes ont une expression modifiée par E2, contre 1 seul attendu par hasard. Ces enrichissements sont présentés selon les profils préalablement établis et concernent des gènes impliqués dans divers processus biologiques, fonctions moléculaires, compartiments cellulaires ou réponses à des produits chimiques connus. Le groupe de gènes dont l'expression est augmentée par E2 (« increased ») est celui qui présente le plus d'enrichissements. Ainsi dans ce groupe, il y a aussi un enrichissement significatif des gènes impliqués dans l'activité des canaux calciques et des exopeptidases. Parmi les composants cellulaires, les composants membranaires et extracellulaires

(membranes plasmique et basale, surface cellulaire, région extracellulaire, matrice extracellulaire) sont enrichis dans le groupe « increased ». Il est cependant à noter que dans le groupe « decreased » (gènes dont l'expression est réduite par E2), ces composants cellulaires semblent également enrichis mais de façon non significative. Le domaine protéique 3 de la fibronectine, un composant de la membrane basale, est également significativement enrichi dans le groupe « increased ».

L'intégration des données issues de la *Comparative Toxicogenomic Database* (CTD) dans l'analyse révèle dans le groupe « increased » un enrichissement de gènes dont l'expression est également modifiée par la trétinoïne (acide carboxylique de la vitamine A), la zéaralénone, la génistéine et le bisphénol A (3 perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique) ainsi que la mifepristone (antagoniste du récepteur de la progestérone). Les substances endogènes telles que la progestérone et la vitamine A sont plutôt représentées dans le groupe « decreased ». Les trois groupes sont enrichis en gènes modifiés par E2, ce qui est cohérent puisque la molécule utilisée dans notre étude est la même. L'Ethinyl Œstradiol, chimiquement très proche de l'E2, présente un profil similaire. L'analyse montre aussi dans le groupe « decreased » un enrichissement de gènes également modifiés par d'autres produits chimiques perturbateurs endocriniens (dexaméthasone, méthotrexate, diethylnitrosamine, phtalates).

Sachant qu'à cet âge (1 jpn), la formation des follicules ovariens à partir des cordons ovariens est en cours, nous avons souhaité nous concentrer sur les processus physiologiques impliqués dans cette formation, soit cycle cellulaire, méiose et réparation de l'ADN, apoptose et remodelage de la membrane basale (Beaumont & Mandl, 1962, Di Giacomo *et al.*, 2005, Pepling & Spradling, 2001, Rajah *et al.*, 1992). Les gènes dérégulés dans notre modèle sont représentés en gras (fig. 63) et associés à un nœud de couleur selon le profil de la dérégulation de leur expression : augmentée (rouge) ou diminuée par rapport au témoin (bleu) ou ayant un effet opposé à faible ou forte dose (vert). Les autres gènes codent pour des protéines connues dans les bases de données pour interagir physiquement et de façon directe avec les protéines issues des gènes dont l'expression est modifiée par l'E2. Ces protéines partenaires sont associées à un nœud dont la couleur est associée aux processus dans lesquels les protéines sont impliquées. L'interactome montre que certains gènes modifiés par E2 agissent en collaboration avec de nombreux autres gènes gouvernant le cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse aux dommages de l'ADN, la formation de la matrice extracellulaire et le métabolisme des stéroïdes, suggérant que tous ces processus sont des cibles du traitement à l'œstradiol, notamment par son action sur des gènes-clés. Ainsi, *Isyna1*, *Psmb9*, *Rrm2* et *Sgk1*, affectés par E2, ont de très nombreux partenaires et interagissent entre eux de façon indirecte puisqu'ils ont tous un partenaire commun : *Ubc*. Par ailleurs, les gènes sont souvent impliqués dans plusieurs processus. La famille des *Psmb* est par exemple impliquée dans la gestion du cycle cellulaire, l'apoptose et la gestion des dommages à l'ADN, démontrant la forte connexion entre ces différents processus.

Lésions et réparations de l'ADN dans l'ovaire néonatal

Au moment de la naissance, l'ovocyte est engagé dans la méiose et son matériel génétique est donc en cours de remaniement, produisant des cassures de l'ADN afin d'y induire des recombinaisons. Or l'E2, aux propriétés génotoxiques, est susceptible de générer des dommages supplémentaires. Nous avons donc mesuré les dommages portés par l'ADN des cellules ovariennes deux heures après traitement à l'E2 (fig. 64 A). La catégorisation des dommages est empirique, basée sur l'observation de nombreuses cellules « comètes ». Le contrôle positif (MMS) présente des dommages plus importants que le témoin, confirmant la rapidité de diffusion et d'action du produit malgré le mode de traitement (injection sous cutanée dans le pli du cou de l'animal). La proportion de cellules peu endommagées (moins de 10 % de l'ADN présent dans la queue de la comète) est similaire dans tous les groupes, traités comme témoin. C'est également le cas de la proportion de cellules ayant entre 30 et 70 % d'ADN dans la queue. En revanche, de façon très étonnante, la proportion de cellules modérément endommagées (entre 10 et 30 % d'ADN dans la queue) est significativement plus faible dans les ovaires d'animaux traités à faible dose que dans les ovaires témoins. Et cette proportion augmente avec la dose : à forte dose elle est significativement plus importante qu'à faible dose (mais sensiblement la même que chez les témoins). À l'inverse, la proportion de cellules très endommagées (plus de 70 % d'ADN dans la queue) est significativement plus importante à faible dose qu'à forte dose, où cette proportion est similaire à celle du groupe témoin. Le test en présence de hOGG1, un révélateur des lésions dues aux ERO, (fig. 64 B), montre que les cellules sont plus endommagées mais le profil est le même, indiquant que l'organe subit un stress oxydant mais que celui-ci n'est pas plus important chez les animaux traités. Afin d'évaluer la capacité de l'organe à réparer son ADN endommagé, nous avons refait le test à 24 heures (soit 20 heures après le traitement). En l'absence de hOGG1 (fig. 64 C), les profils lésionnels sont très différents de ceux observés de façon précoce. Si la répartition des cellules selon leur degré d'endommagement est similaire chez les témoins entre 6 et 24 heures, à faible dose la proportion de cellules peu endommagées est plus importante que chez le témoin, ce qui n'est pas le cas avec les autres doses. Les cellules modérément endommagées (10 à 30 % d'ADN dans la queue) sont moins nombreuses à faible dose et à forte dose. En revanche les cellules très endommagées (> 70 % ADN dans la queue) sont plus nombreuses dans tous les groupes traités et particulièrement à forte dose. Les profils à 6 et 24 heures sont donc très modifiés entre les conditions de traitement. Collectivement, ces données suggèrent que les mécanismes de réparation de l'ADN dans les organes d'animaux traités à faible dose sont plus efficaces que ceux déployés à forte dose, où les dommages persistent et s'aggravent. Enfin, alors que la révélation des sites endommagés par les ERO (fig. 64 D) dans le groupe témoin fait passer de 12 à 34 % la proportion de cellules très endommagées (> 70 % d'ADN dans la queue), cette variation est inférieure à 10 % dans les groupes traités, suggérant une moindre responsabilité des ERO dans les dommages induits par E2.

La réparation des lésions de l'ADN faisant intervenir précocement la protéine H2AX (Rogakou *et al.*, 1998), nous avons souhaité évaluer sa présence dans les ovocytes à 24 heures (fig.65 A). Il semble que le nombre d'ovocytes exprimant cette protéine soit plus faible chez les animaux traités, toutefois la faiblesse des effectifs rend impossible toute conclusion ferme. Outre cette protéine de réparation, l'étude prospective par microarray a révélé que Rrm2, Psmb9 et H3f3b, tous trois impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN (GO : 0006974) avaient une expression modifiée suite au traitement par l'œstradiol, ce que nous avons souhaité vérifier en qPCR. Rrm2 (fig. 65 B) présente un profil similaire sur les microarrays et en qPCR, bien que l'augmentation de l'expression relative constatée à la dose faible ne soit pas statistiquement significative. Psmb9 (fig. 65 C) présente un profil différent entre les puces et la qPCR. L'augmentation de son expression à la dose faible observée sur les puces n'est pas reproduite. Bien que non statistiquement significative, l'expression de ce gène tend à décroître avec la dose d'E2, ce qui est cohérent avec les puces. Le profil d'H3f3b (fig. 65 D) est similaire sur les puces et en qPCR, son expression semble être augmentée par l'E2 (mais de façon non significative). La détection de ces 3 gènes en HIS (respectivement fig. 65 E, F et G) n'est pas concluante, le signal étant trop faible.

Régulation de la mort ovocytaire

Devant l'étendue constatée des lésions de l'ADN, la forte représentation des gènes impliqués dans l'apoptose dans l'interactome ovarien modifié par E2 et le fait que nous menions cette étude à 1 jpn pendant la vague d'apoptose ovocytaire physiologique, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose : Ednrb et Ddp6 (GO : 0006915). Le profil d'expression en qPCR obtenu pour Ednrb (fig. 66 A) est cohérent avec le profil obtenu en microarray, c'est-à-dire augmentant avec la dose d'E2. L'expression de ce gène est détectable en HIS aux 3 doses testées (fig. 66 B, C, D) et le couplage avec des marquages en immunofluorescence (fig. 66 E, F, G) permet de confirmer l'expression de Ednrb aux 3 doses dans les ovocytes (fortement marqués par Pcna). Un marquage TUNEL révèle également la présence de cellules en apoptose (également aux 3 doses et co-exprimant Ednrb). Le profil d'expression de Ddp6 en qPCR (fig. 66 H) est similaire à celui de Ednrb et cohérent avec les données issues des puces, soit une augmentation dose-dépendante. Le marquage des ARN en HIS dans les ovaires témoins (fig. 66 I), traités à faible dose (fig. 66 J) et à forte dose (fig. 66 K) ainsi que le couplage à l'immunofluorescence (fig. 66 L, M, N) montrent une expression dans les ovocytes et les cellules de la granulosa, particulièrement visible à forte dose (fig. 66 K, N). Là encore, des cellules exprimant Ddp6 sont en apoptose, révélées par un marquage TUNEL. L'expression de régulateurs de l'apoptose est donc modifiée dans les ovaires traités et ce au sein même des cellules germinales. La voie des Pi3K, élément crucial du dialogue entre les cellules de la granulosa et les cellules germinales au cours du développement ovarien et modulant la survie des cellules germinales (Morita *et al.*, 1999; Cecconi *et al.*, 2012), semble également affectée par le traitement par E2 d'après les données issues de l'analyse des puces. L'expression de trois de ses membres a donc été étudiée. Le profil de qPCR de Isyna1 (fig. 67 A) est conforme à celui observé sur

les puces et son expression est très augmentée dans les ovaires traités à forte dose. Elle est croissante avec la dose d'E2 (fig. 67 A et B, C, D). A plus fort grossissement à l'aide de la combinaison de l'HIS et l'immunofluorescence contre Ybx2, marqueur des ovocytes, Isyna1 semble être exprimé surtout dans les ovocytes chez les animaux témoins (fig. 67 E) et majoritairement dans les cellules de la granulosa chez les animaux traités (fig. 67 F, G). Sgk1, autre membre de la voie des PI3K dérégulé par E2 d'après les puces, présente en qPCR (fig. 67 H) un profil similaire à celui révélé par les puces, avec une expression significativement augmentée à la dose faible mais moins à la dose forte. Ceci est illustré en HIS (fig. 67 I, J, K) et l'HIS combinée à un marquage en fluorescence des ovocytes révèle une expression dans les ovocytes ainsi que dans les cellules somatiques (fig. 67 L, M, N). Les ovaires présentent tous des cellules apoptotiques mises en évidence par le marquage TUNEL (fig. 67 E, F, G, L, M, N). Nous avons donc quantifié les ovocytes porteurs de marqueurs d'apoptose en fonction de la dose d'E2 administrée. La proportion d'ovocytes marqués par des indicateurs d'apoptose, Ccasp3 (fig. 67 O) et TUNEL (fig. 67 P), présentent une tendance non significative à l'augmentation en fonction de la dose d'E2. Le nombre d'ovocytes marqués par Foxo3a, membre de la voie des PI3K, est significativement plus élevé dans les ovaires traités à forte dose (fig. 67 Q).

4. DISCUSSION

Ces résultats démontrent que l'œstradiol modifie le transcriptome ovarien à 1 jpn de façon différente à dose faible et à dose forte. L'étude de l'interactome révèle que certains gènes modifiés par E2 agissent en collaboration avec de nombreux autres gènes impliqués dans la gestion dommages de l'ADN, du cycle cellulaire et de l'apoptose et que ces gènes peuvent intervenir dans plusieurs de ces processus, lesquels sont fortement connectés les uns aux autres. À très court terme (2 heures après traitement), les dommages infligés à l'ADN par l'E2 sont plus importants à faible dose qu'à forte dose mais cette tendance s'inverse complètement 20 heures après le traitement. Ces dommages seraient par ailleurs peu liés à la génération d'ERO. Le recrutement de la forme phosphorylée de H2AX, impliqué dans les réparations, semble moins important dans les ovaires préalablement traités, suggérant une atteinte des voies de réparation. Les régulateurs de l'apoptose sont également modifiés par l'œstradiol dans les cellules de la granulosa mais aussi dans les ovocytes. À la dose forte, ceux-ci entrent alors en apoptose.

L'œstradiol modifie le transcriptome ovarien

L'étude du transcriptome nous a permis d'identifier des profils d'expression de gènes en fonction de la dose d'œstradiol reçue par l'animal. Parmi ces profils, 2 rassemblent les gènes spécifiquement modifiés par la dose forte : P3 (gènes dont l'expression augmente après traitement à 10 µg E2) et P5 (gènes dont l'expression diminue à cette dose). Parmi les gènes dont l'expression augmente à forte dose, Mmp7 et Gfra1 ont la particularité de posséder de multiples partenaires annotés avec le *GO term* GO : 0005576 (région extracellulaire). Or à 1 jpn dans l'ovaire, cette région extracellulaire (et plus particulièrement la membrane basale) est en plein remodelage associé à la formation des follicules (Rajah *et al.*, 1992; Mazaud *et al.*, 2005). Ceci suggérerait que la formation folliculaire

pourrait à forte dose être perturbée par cette voie. L'expression de Pgr (récepteur de la progestérone) augmente également avec la dose forte d'E2. Or ce récepteur interagit avec Esr1 (E α , récepteur des œstrogènes). Ces 2 hormones ont été proposées comme inhibiteurs de la formation folliculaire chez la ratte et la vache (Kezele & Skinner, 2003 ; Nilsson & Skinner, 2009). Au moment de la formation folliculaire, la synthèse endogène de E2 et progestérone (P4) diminue chez la vache (chez qui la formation folliculaire a lieu *in utero* ; Nilsson & Skinner, 2009). La naissance constitue chez la ratte une levée de l'imprégnation hormonale maternelle conduisant à la chute du taux circulant de l'E2 (Kezele & Skinner, 2003 ; article 1). Donc les voies utilisées par E2 et P4 seraient interconnectées et la modification du taux d'E2 entraînerait la modification de l'expression d'un des acteurs de la signalisation par P4.

Parmi les gènes dont l'expression diminue à forte dose, Alb, Aox1, Star et Afp sont connus pour intervenir dans le métabolisme des stéroïdes ou interagir avec des protéines impliquées dans ce métabolisme. Ceci démontre la capacité d'E2 à modifier le métabolisme des stéroïdes (dont il fait partie) et confirme ce qui a été démontré antérieurement (article 1).

Par ailleurs, les enrichissements observés entre les gènes dont l'expression augmente à la suite du traitement et des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique ou anti-œstrogénique connus pourraient constituer une signature transcriptomique spécifique puisqu'à l'inverse, des perturbateurs endocriniens à activité androgénique (diethylnitrosamine, Ostrowski *et al.*, 1988) ou anti-androgénique (dexaméthasone, Redmond *et al.*, 1990 ; phtalates, Stroheker *et al.*, 2005, Desdoits-Lethimonier *et al.*, 2012) sont plutôt représentés parmi les enrichissements du groupe composés des gènes dont l'expression diminue avec le traitement.

L'œstradiol induit des lésions supplémentaires de l'ADN

Nos résultats révèlent de plus nombreux dommages de l'ADN dans les ovaires traités à l'E2 mais pas d'augmentation du nombre d'ovocytes marqués par γ H2AX (voire une diminution). Ceci peut s'expliquer si l'ADN porte des lésions autres que des cassures double brin. Les cassures induites par E2 pourraient ne concerner qu'un seul des deux brins. Or les mécanismes de réparation de ces 2 types de cassures sont différents. Les cassures double brin sont d'abord détectées par le complexe MRN (Mre11 / Rad50 / Nbs1) (Ivanov *et al.*, 1992; Sharples & Leach, 1995; Connelly & Leach, 1996). Ce détecteur recrute la protéine Atm, elle-même à l'origine du recrutement très rapide et de la phosphorylation de l'histone H2AX en γ H2AX, impliquée dans la réparation et utilisée comme marqueur des cassures double brin (Rogakou *et al.*, 1998, Hunter *et al.*, 2001, Sedelnikova *et al.*, 2002). Puis en aval sont recrutés des effecteurs des réparations. Ces mécanismes sont partagés par les réparations cassures double brins établies hors processus méiotique par d'autres agressions de l'ADN (Paull *et al.*, 2000; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Les cassures simples brins en revanche ne sont pas détectées par le complexe MRN mais par la protéine Rpa (replicative protein A) responsable de l'activation et du recrutement d'Atr (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related), médiateur induisant le recrutement des effecteurs de réparations (Cortez *et al.*, 2001; Lupardus *et al.*, 2002). La détection par immunohistochimie de Rpa soit sur des coupes histologiques, soit sur des étalements d'ovaire,

permettrait de tester l'abondance des cassures simple brin en fonction de la dose. Un test des comètes en conditions plus ou moins alcalines (voir *Matériel et Méthodes*, « test des comètes », page 167) permettrait aussi de quantifier différenciellement les types de cassures. Rpa est impliquée dans la réparation des erreurs de synthèse de l'ADN telles que les mésappariements (Conde-Perezprina *et al.*, 2012), les excisions de base ou de nucléotide (pour revue, Dianov & Hubscher, 2013; Niedernhofer, 2008). Ces mécanismes sont également mis en jeu à la suite de la génération d'adduits à l'ADN or E2 est capable d'en générer, notamment après sa bioactivation par Cyp1b1 (Zahid *et al.*, 2006). Cyp1b1 est justement exprimé de façon constitutive dans l'ovaire par les ovocytes (Muskhelishvili *et al.*, 2002). Ceci suggère donc une forte production de cassures simple brin et de réparation d'adduits dans les ovocytes de notre modèle. Il serait donc intéressant de savoir si la proportion d'ovocytes portant des cassures simple brin augmente avec le traitement, par exemple à l'aide d'un marquage de Rpa en immunohistochimie. Par ailleurs, l'importante proportion de cellules hautement endommagées à forte dose à 1 jpn reflète à la fois les dommages directs causés par E2, l'inefficacité des systèmes de réparations mis en place et l'aiguillage des cellules vers l'apoptose, processus induisant la fragmentation de l'ADN.

L'influence de l'E2 sur la génération de lésions dues aux ERO est controversée. Dans les lymphocytes, l'E2 induit des lésions via les ERO (Cemeli & Anderson, 2011). Mais dans le cerveau, E2 augmente la réponse aux ERO et la réparation de l'ADN endommagé par cette voie (Dietrich *et al.*, 2013). Donc E2 est à la fois source de lésions et de réparations. Ceci pourrait en partie expliquer les différences liées aux doses utilisées dans notre étude : à faible dose, l'effet protecteur l'emporte sur l'effet délétère mais pas à forte dose.

D'après l'analyse du transcriptome, le système de réparation des dommages de l'ADN semble touché par le traitement. Bien que la faiblesse des effectifs réduise la puissance statistique et rende difficile l'interprétation des données de qPCR sur Rrm2, Psmb9 et H3f3b, il semble tout de même que cette tendance se confirme. Les résultats de qPCR de Rrm2, bien que non significatifs, semblent indiquer une meilleure réparation à faible dose qu'à forte dose. En effet, Rrm2 est responsable de la conversion des riboncléosides diphosphates en désoxyriboncléosides diphosphates, ceux-ci étant indispensables à la synthèse et la réparation de l'ADN (Thelander & Berg, 1986, Jordan & Reichard, 1998). L'expression de Psmb9, qui tend à diminuer avec la dose d'E2, serait également en faveur d'une meilleure réparation à faible dose. Psmb9 (aussi connu sous le nom de Lmp2) n'est pas seulement impliqué dans la réparation de l'ADN, il s'agit également d'un point chaud de recombinaison, un site particulièrement ciblé par les cassures double brin induites physiologiquement pour favoriser les recombinaisons homologues au cours de la méiose (Shiroishi *et al.*, 1991). On peut donc supposer qu'il est particulièrement touché par les cassures double brin. La transcription étant impossible sur les gènes touchés par ces cassures, la diminution de l'expression de Psmb9 pourrait alors refléter le retard de sa réparation chez les animaux traités. À l'inverse l'expression de H3f3b augmente avec le traitement, or ce gène est impliqué dans la condensation de la chromatine non seulement au cours de la mitose et la méiose mais aussi au cours de l'apoptose (pour revue, Prigent & Dimitrov, 2003).

Toutefois, l'expression de ces 3 gènes étant sous le seuil de détection en HIS, les qPCR réalisées sur ovaire total ne permettent pas de conclure que ces variations d'expression sont liées à l'impact du traitement sur les cellules méiotiques (germinales) plus que sur les cellules somatiques, bien que ces gènes, de par leurs fonctions et leur implication dans le processus méiotique, soient vraisemblablement exprimés dans l'ovocyte. Le co-marquage en immunofluorescence de protéines impliquées dans les réparations de l'ADN (telles que Rad51, Mlh1 ou PcnA Essers *et al.*, 2005) et des ovocytes permettrait de répondre à la question de la réparation en fonction de la dose.

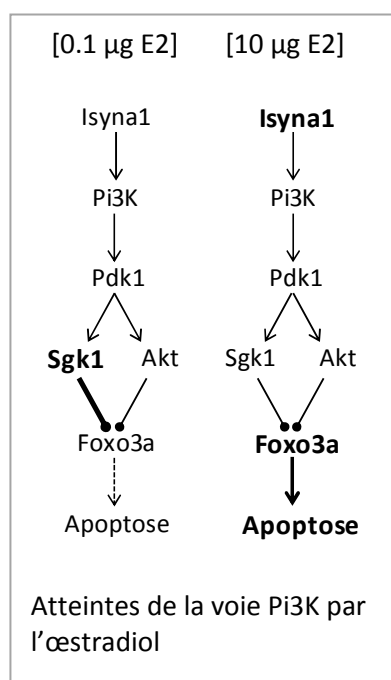
Une étude menée sur le rat mâle exposé à de l'E2 a montré que celui-ci ralentissait le passage au stade diplotène (Liu *et al.*, 2013). Ceci serait lié à la persistance de lésions de l'ADN et au blocage de l'avancée méiotique par le système de contrôle de l'intégrité du matériel génétique qui se met en place au stade pachytène (« pachytene checkpoint ») (Roeder & Bailis, 2000). Or dans l'ovaire l'avancement méiotique est un pré-requis pour la formation des follicules qui a lieu quand les ovocytes entrent en quiescence, arrêtés au stade diplotène (Di Giacomo *et al.*, 2005 ; Paredes *et al.*, 2005 ; Beaumont & Mandl, 1962). Cependant, l'ovocyte a tendance à outrepasser les points de contrôle, il est plus à même de laisser se poursuivre la méiose avec des erreurs que les gamètes mâles (Hunt & Hassold, 2002). Ceci suggère que les dommages induits par E2, s'ils ne déclenchent pas l'apoptose, peuvent échapper aux contrôles, persister au-delà du stade pachytène, demeurer latents pendant la formation des follicules et être réparés au cours du long stade dictyé. C'est le cas de souris dont certains gènes gouvernant l'apoptose ont été invalidés, empêchant la mort des cellules malgré de hauts degrés de lésions de l'ADN. Chez ces animaux, les ovocytes survivent aux radiations et ont à l'âge adulte la capacité de former des embryons viables (Kerr *et al.*, 2012). Cependant cette théorie est controversée puisque des souris traitées à la naissance avec de la génistéine présentent des anomalies méiotiques à l'âge adulte, plaidant en faveur de la persistance des dommages (Jefferson *et al.*, 2009).

Un marquage des ovocytes au stade diplotène (par exemple Par6, Wen *et al.*, 2009) combiné avec des marquages de dommages de l'ADN et de réparation serait un bon indicateur d'une part pour savoir si E2 induit des dommages à la fois sur les ovocytes en cours de méiose et sur les ovocytes déjà entrés en quiescence, et d'autre part si les lésions persistent après le stade pachytène et si l'ovocyte continue à réparer. Toutefois, l'ovocyte perd l'expression de ses marqueurs spécifiques à mesure qu'il avance dans le processus apoptotique, rendant difficiles les doubles marquages.

Le dilemme ovocytaire : survie ou mort ?

Dans notre système, l'analyse des microarrays nous a permis d'isoler plusieurs catégories de transcrits modifiés par l'œstradiol. Parmi eux 10 sont dérégulés de la même façon, indépendamment de la dose (correspondant aux profils P2 et P6). Malgré les lacunes d'annotation des puces, il semble qu'au moins deux de ces transcrits, Cd38 et RGD1563556, codent pour des protéines agissant en partenariat avec des protéines impliquées dans le processus d'apoptose. RGD1563556 est l'homologue de KIAA1377 humain et AK129341, il est plus exprimé après traitement à l'œstradiol, à la dose faible comme à la dose forte et possède 15 partenaires protéiques connus impliqués dans

l'apoptose (GO : 0006915). Ces données suggèrent que quelle que soit la dose, l'œstradiol active cette voie de l'apoptose. Les profils P3 et P5, concernant les gènes dont l'expression est spécifiquement modifiée par la dose forte, montrent que celle-ci active d'autres gènes codant pour des protéines agissant en partenariat avec d'autres protéines intervenant dans l'apoptose (Isyna1, Hunk, Grm7, Mmp7, Eif3, Atp6v0a4). Les voies de l'apoptose comprennent 2 types de molécules : les anti-apoptotiques, en faveur de la survie cellulaire, et les pro-apoptotiques, conduisant à la mort cellulaire. Nos résultats montrent que les ovaires traités expriment de façon dose dépendante Ednrb, de façon cohérente entre puces et qPCR. Ednrb est un récepteur (récepteur b des endothélines) aux propriétés anti-apoptotiques : il est indispensable à l'action de l'endothéline 3, un facteur mitotique. Ednrb est connu dans l'ovaire pour être exprimé par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (Iwai *et al.*, 1993) et impliqué dans le contrôle de l'ovulation (Palanisamy *et al.*, 2006). Dans notre modèle, Ednrb est plus fortement exprimé dans les ovocytes et particulièrement chez les animaux traités à forte dose. Le profil d'expression de Dpp6 est le même : plus exprimé à forte dose et présent dans les ovocytes mais aussi dans les cellules de la granulosa. L'expression de Dpp6, initialement connue dans le cerveau, a été rapportée dans l'ovaire adulte (Wada *et al.*, 1992) et est impliqué dans la réparation de l'ADN (Reinhold *et al.*, 2009). Collectivement ces données suggèrent que malgré les lésions induites à la suite du traitement à l'E2, l'ovocyte active des mécanismes de défense même à la dose la plus forte.



Outre ces facteurs anti-apoptotiques, l'E2 modifie plusieurs acteurs appartenant à une même voie de signalisation cellulaire : la voie des Pi3K. Cette voie intervient dans de multiples processus cellulaires mais surtout dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle, la survie ou l'apoptose (KEGG rno04151). Isyna1 active la Pi3k en synthétisant son substrat, le phosphatidyl-inositol, ce qui induit l'activation de Sgk1 et Akt, lesquels sont répresseurs de Foxo3a, inducteur d'apoptose (Brunet *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2011). Mais Akt peut aussi être régulé par 2 autres protéines de la famille Pi3K : Atm et Atr, impliquées dans la gestion des dommages de l'ADN (Evan & Littlewood, 1998). Les 2 doses d'E2 utilisées au cours de cette étude ont un impact différent sur la voie Pi3K. La dose faible induit une augmentation de Sgk1 qui réprime Foxo3a ce qui a pour effet de ne pas induire l'apoptose. À forte dose, la voie Pi3K est activée en amont mais Sgk1 n'est pas modifié

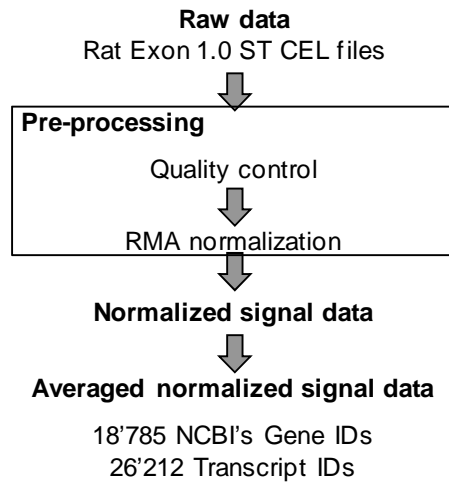
significativement. Il est possible que la voie de signalisation empruntée passe par Akt, régulé par Atm/Atr (Mukherjee & Burma, 2011). Foxo3a est exprimé dans un plus grand nombre d'ovocytes que chez les animaux témoins ou traités à faible dose, traduisant une apoptose plus importante. Les autres marqueurs de l'apoptose (Casp3 et TUNEL) ne sont pas significativement modifiés (malgré une tendance à la hausse en fonction de la dose) mais leur signal est très transitoire, respectivement en début de processus et à la fin pendant la fragmentation de l'ADN. Foxo3a est en revanche exprimé

tout au long du processus, facilitant ainsi sa détection. Collectivement, ces données désignent également les ovocytes comme population cellulaire cible du traitement, soit de façon directe, soit de façon indirecte via le dialogue instauré entre les cellules somatiques et les cellules germinales via la voie Pi3K. L'altération de l'expression de divers régulateurs de l'apoptose, via la voie des Pi3K ou non, conduit à l'augmentation de l'apoptose des cellules germinales des ovaires traités à forte dose. En revanche, malgré la présence de dérégulations également constatées à faible dose, il n'y a pas d'apoptose massive parmi les cellules germinales.

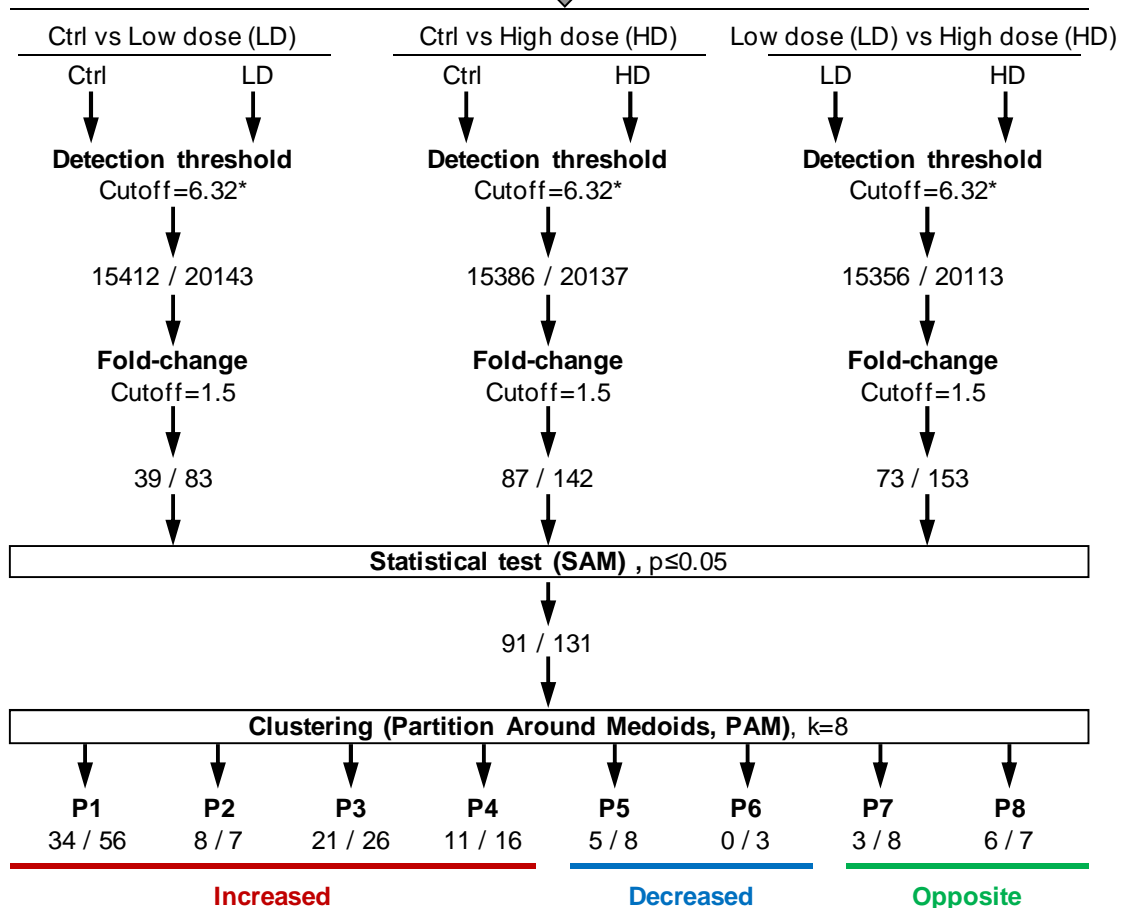
Cette étude montre que l'E2 modifie le transcriptome ovarien de façon différente selon la dose et induit de nombreuses lésions de l'ADN. Selon la dose utilisée, les modifications transcriptomiques font pencher la balance en faveur des facteurs de réparation de l'ADN et de survie cellulaire (dose faible) ou en faveur des facteurs de mort (dose forte) au sein des ovocytes. Ceci est cohérent avec nos observations lors d'une étude précédente ([article 1](#)) au cours de laquelle nous avons noté une réduction drastique du nombre de cellules germinales à forte dose mais pas de modification de ce nombre à faible dose.

FIGURES :

A



B



* 25th percentile value of the overall intensity signals

Figure 60. Stratégie de filtration des données et de classification des gènes. **A** : Normalisation des données de tous les transcrits présents sur la puce. **B** : Vue générale du processus de sélection des gènes après comparaison des conditions de traitement 2 à 2. Le nombre de gènes et de transcrits sont donnés après chaque étape de filtration. Les 91 gènes (131 transcrits) restant sont répartis en 8 groupes (« clusters ») établis sur la base des similitudes entre les différents profils d'expression. Ctrl : Contrôle LD : « Low Dose », faible dose HD : « High Dose », forte dose

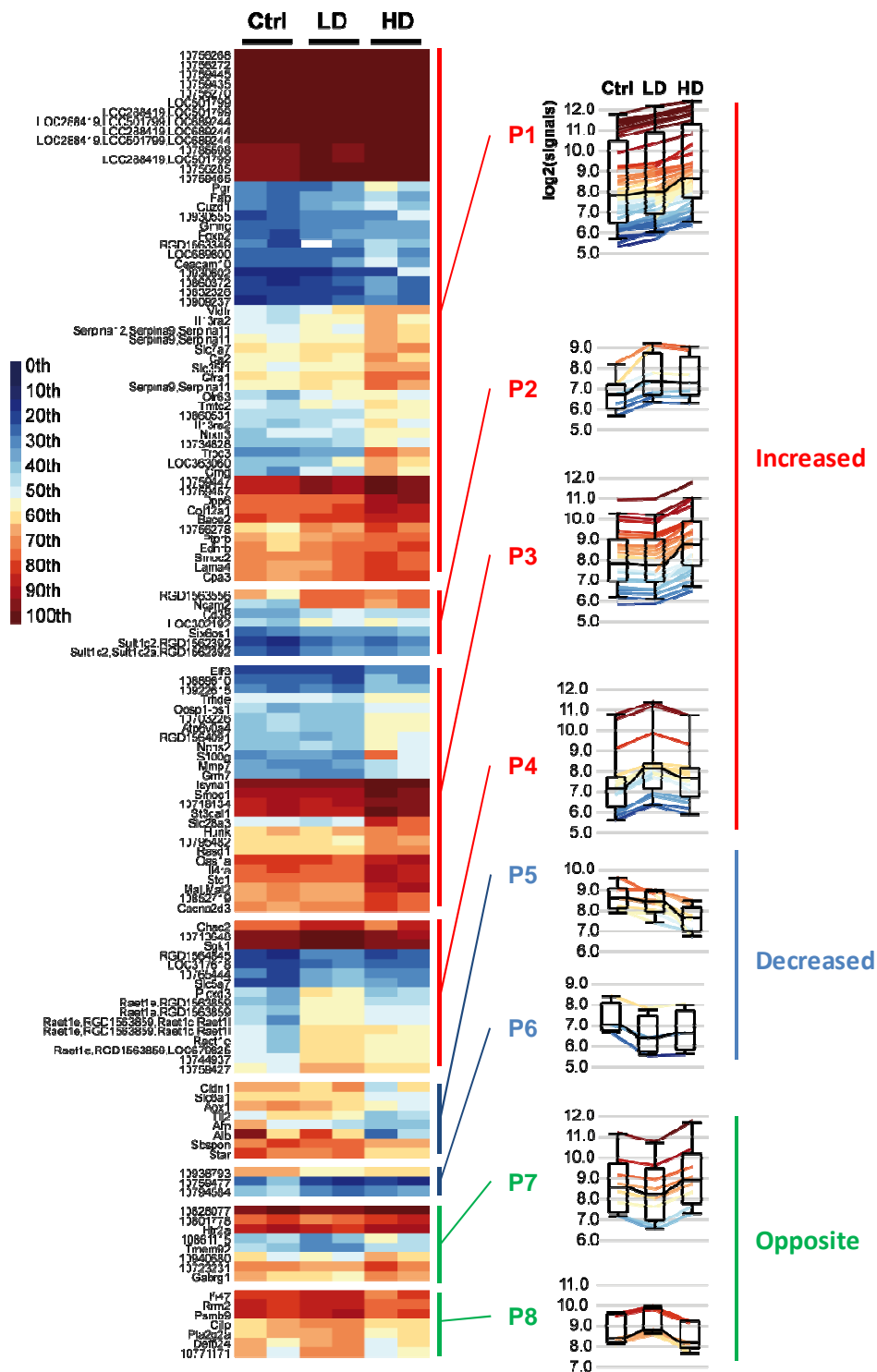


Figure 61: Profilage du transcriptome ovarien selon la dose d'E2.

La cartographie colorimétrique (« *heatmap* », à gauche) représente l'intensité d'expression de chaque transcrite en fonction du traitement selon l'échelle de couleur présentée à gauche. 1 ligne correspond à 1 transcrite et ces transcrits sont classés selon leurs profils d'expression en fonction de la condition de traitement (Ctrl : Contrôle; LD : « *Low Dose* », faible dose; HD : « *High Dose* », forte dose). Les différents types de profils d'expression, représentations linéaires de la cartographie colorimétrique, sont présentés à droite. Les profils P1 à P4 correspondent aux gènes dont l'expression est augmentée par l'E2. Les profils P5 et P6 rassemblent les gènes dont l'expression est réduite. Les profils P7 et P8 rassemblent des gènes sur lesquels la dose faible et la dose forte d'E2 ont des actions opposées.

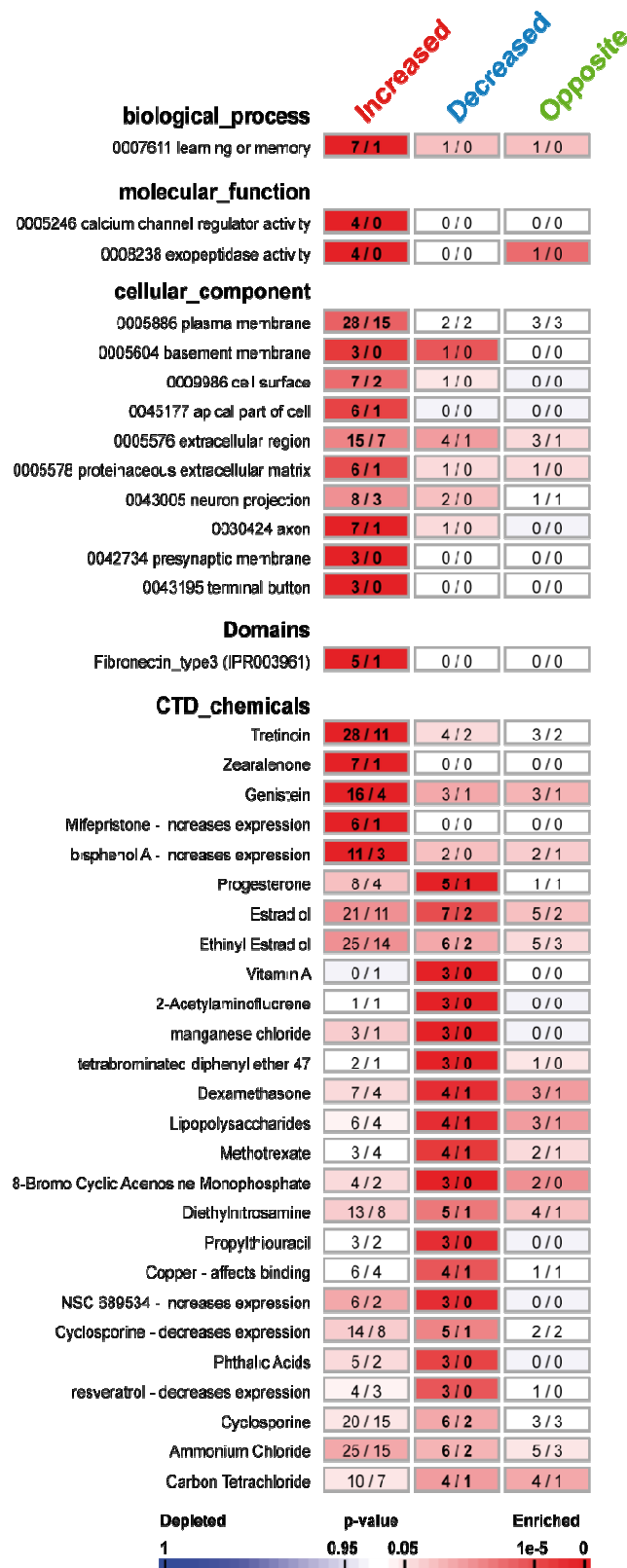


Figure 62 : Enrichissements parmi les gènes répondant à l'œstradiol.

Chaque rectangle indique le nombre de gènes observés (à gauche) et le nombre de gènes attendus (à droite) si leur sélection était le fruit du hasard. Les chiffres en gras indiquent les enrichissements significatifs ($p < 10^{-6}$, analyse via AMEN), conformément à l'échelle de couleur indiquée en bas. Les enrichissements sont présentés selon la classification des profils d'expression (en colonnes) et selon le terme GO associé (en lignes). Les termes GO utilisés ici correspondent à des processus biologiques, des fonctions moléculaires, des composants cellulaires, des domaines protéiques ou des produits chimiques.

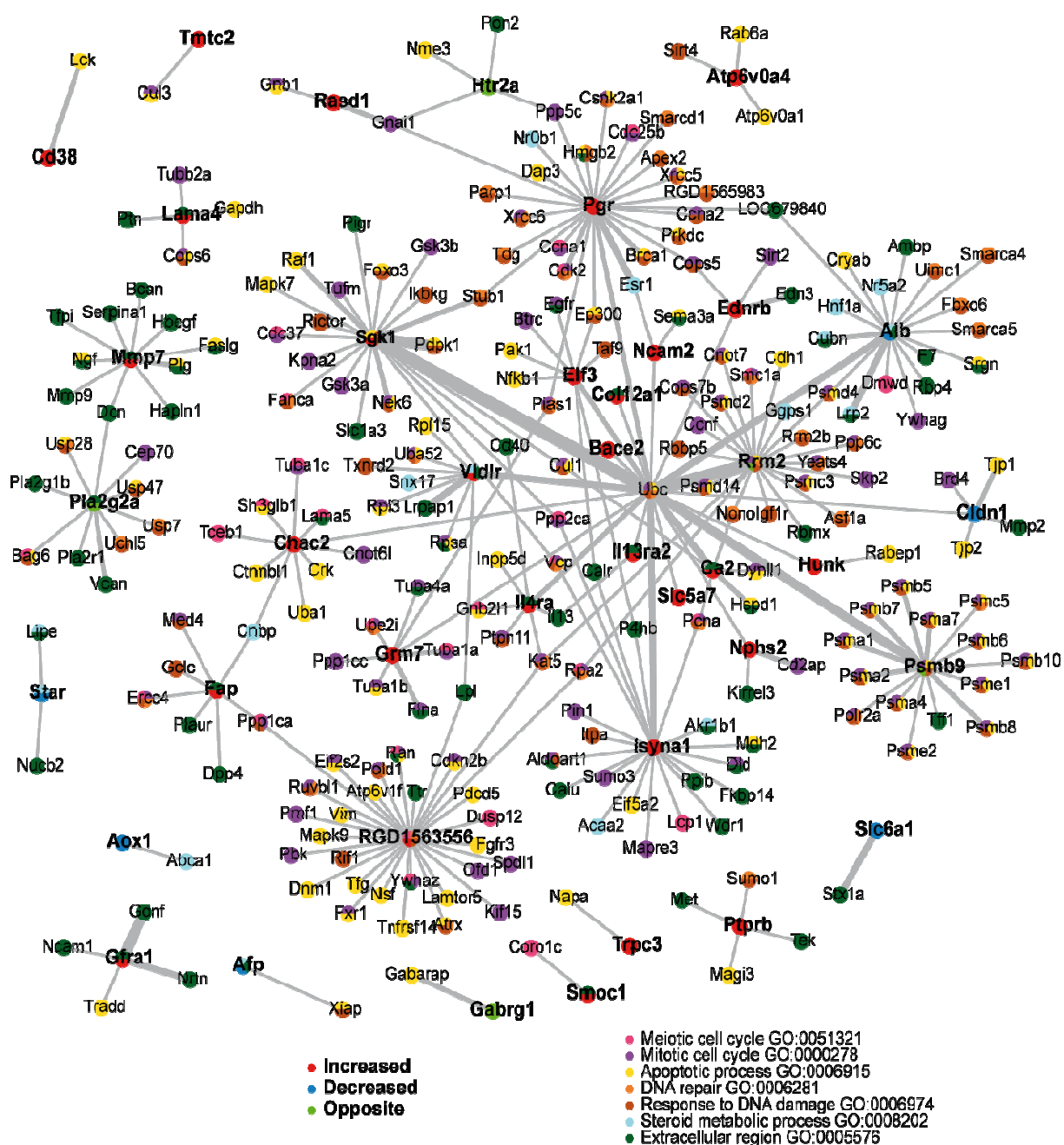


Figure 63: Analyse du réseau d'interactions protéiques entre les produits de gènes répondant à l'œstradiol et leurs partenaires.

Chaque nœud correspond à un gène. Les gènes dérégulés par l'E2 dans l'ovaire (en gras) ont un nœud de la couleur correspondant à leur profil de variation d'expression (légende de gauche). Chaque trait représente une interaction directe protéine-protéine connue. L'épaisseur du trait est corrélée au nombre de publications concernant cette interaction. Les gènes partenaires sélectionnés et présentés sont impliqués dans diverses fonctions telles que le cycle cellulaire, l'apoptose, la gestion des dommages à l'ADN, le métabolisme des stéroïdes et la région extracellulaire. Chaque fonction est associée à une couleur de nœud (légende de droite).

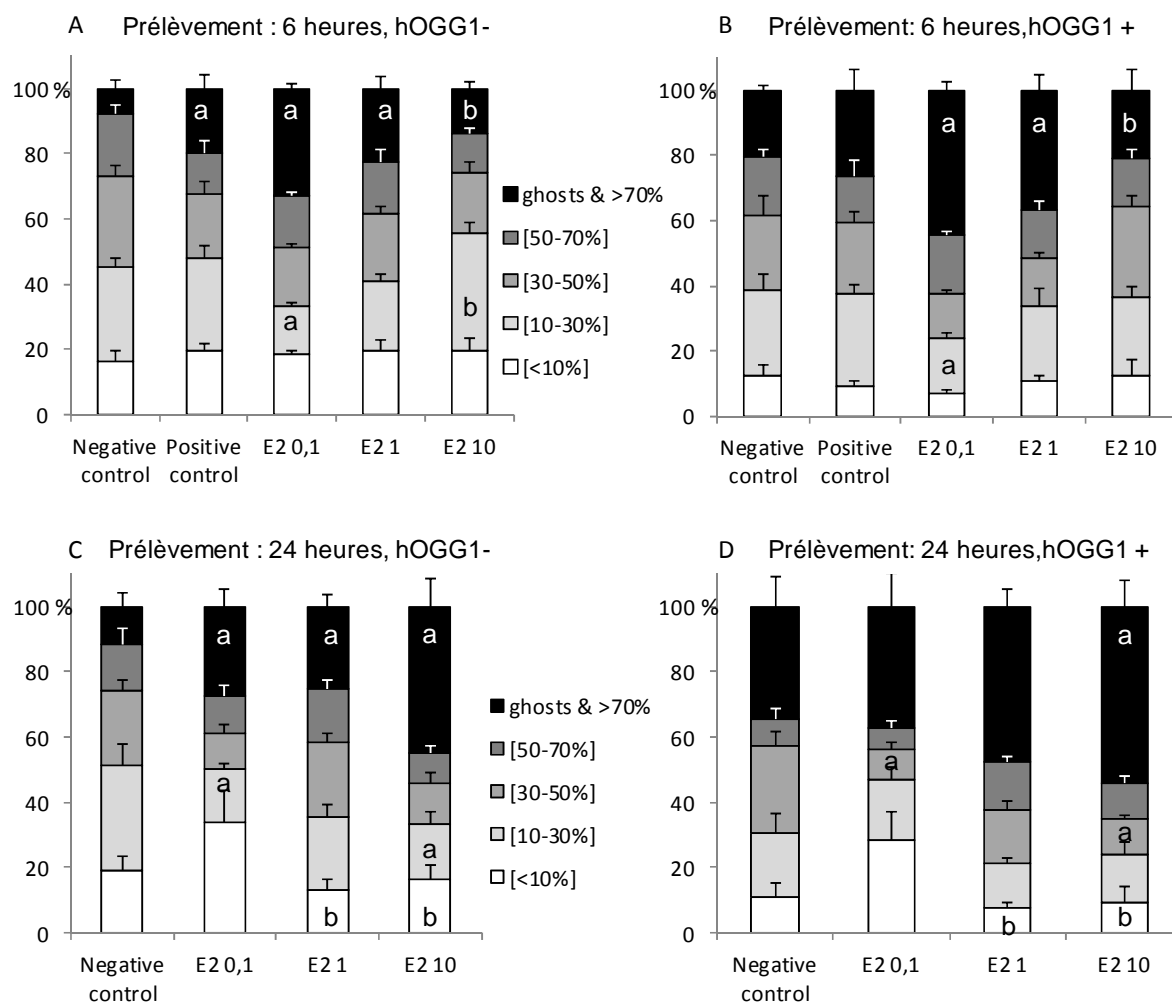


Figure 64 : Lésions primaires portées par l'ADN de cellules ovariennes d'animaux nouveau-nés traités avec de l'E2.

Le traitement a été administré 4 heures après la naissance et les prélèvements réalisés à 6 (**A-B**) ou 24 heures post-natales (**C-D**). L'ajout de hOGG1 (**B-D**) pendant le test révèle (outre les cassures simple et double brin) les dommages infligés par les ERO. Les graphiques présentent le pourcentage de cellules dans chaque condition de traitement appartenant à 5 catégories définies selon le pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes. < 10 % = cellules peu endommagées. > 70 % = cellules très endommagées. Les « ghosts cells » sont des cellules n'ayant presque plus d'ADN dans la tête de la comète.

a : la catégorie dans laquelle la lettre est présente est différente de la même catégorie chez le témoin ($p < 0,05$)

b : catégorie différente de la même catégorie chez les animaux traités à la dose faible ($p < 0,05$)

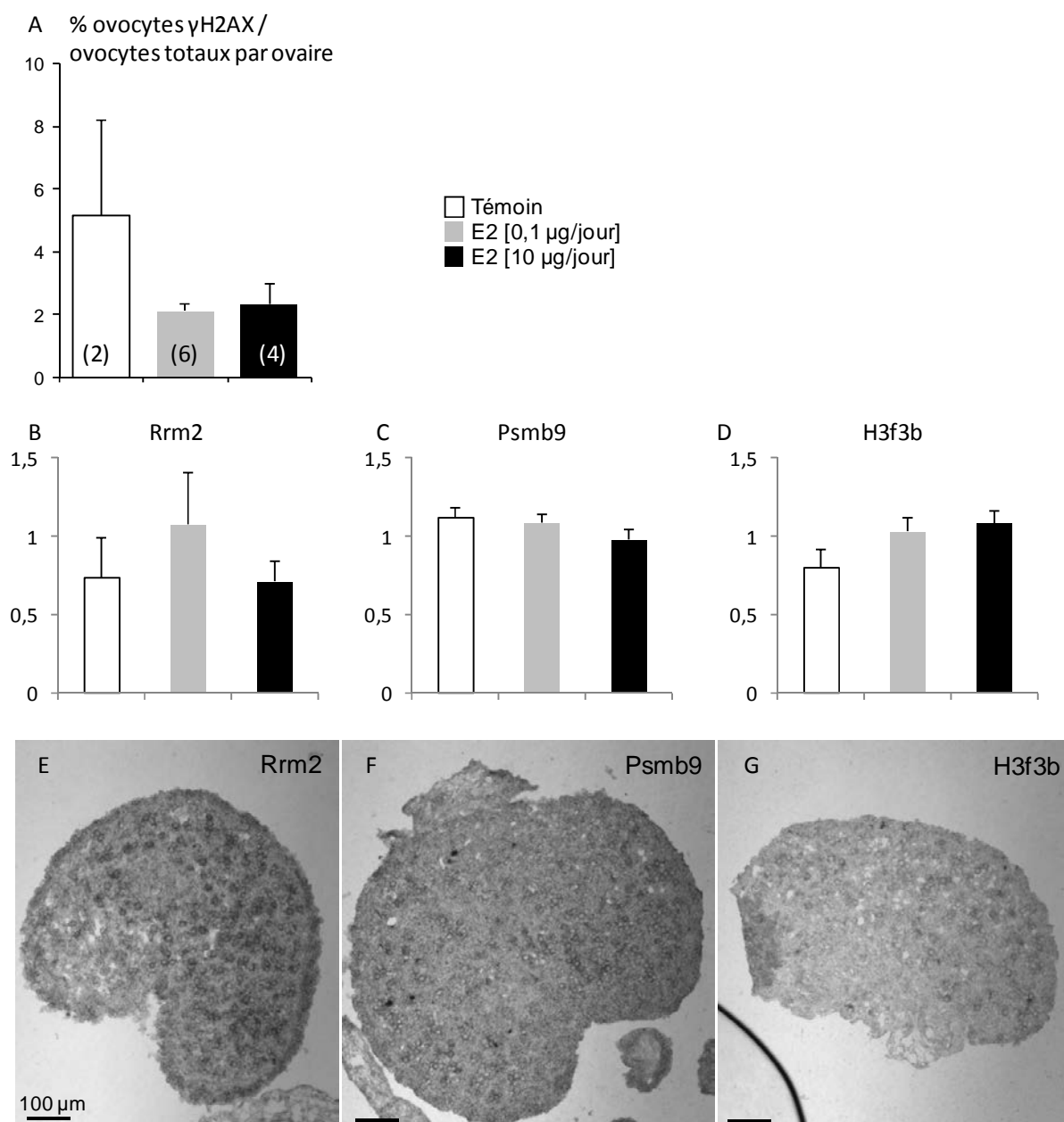


Figure 65 : Réparations de l'ADN dans l'ovaire à 1 jpn.

A : Comptage après détection par immunohistochimie des ovocytes porteurs de γ H2AX après traitement à l'œstradiol. Effectifs indiqués entre parenthèses. Les ovocytes totaux par ovaire ont été préalablement comptés après un marquage Tra98. **B-D** : Quantification relative par qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la réparation de l'ADN. **E-G** : Marquage par hybridation *in situ* de l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la réparation de l'ADN. Rrm2, Psmb9 et H3f3b sont peu exprimés dans l'ovaire, le signal est proche du bruit de fond.

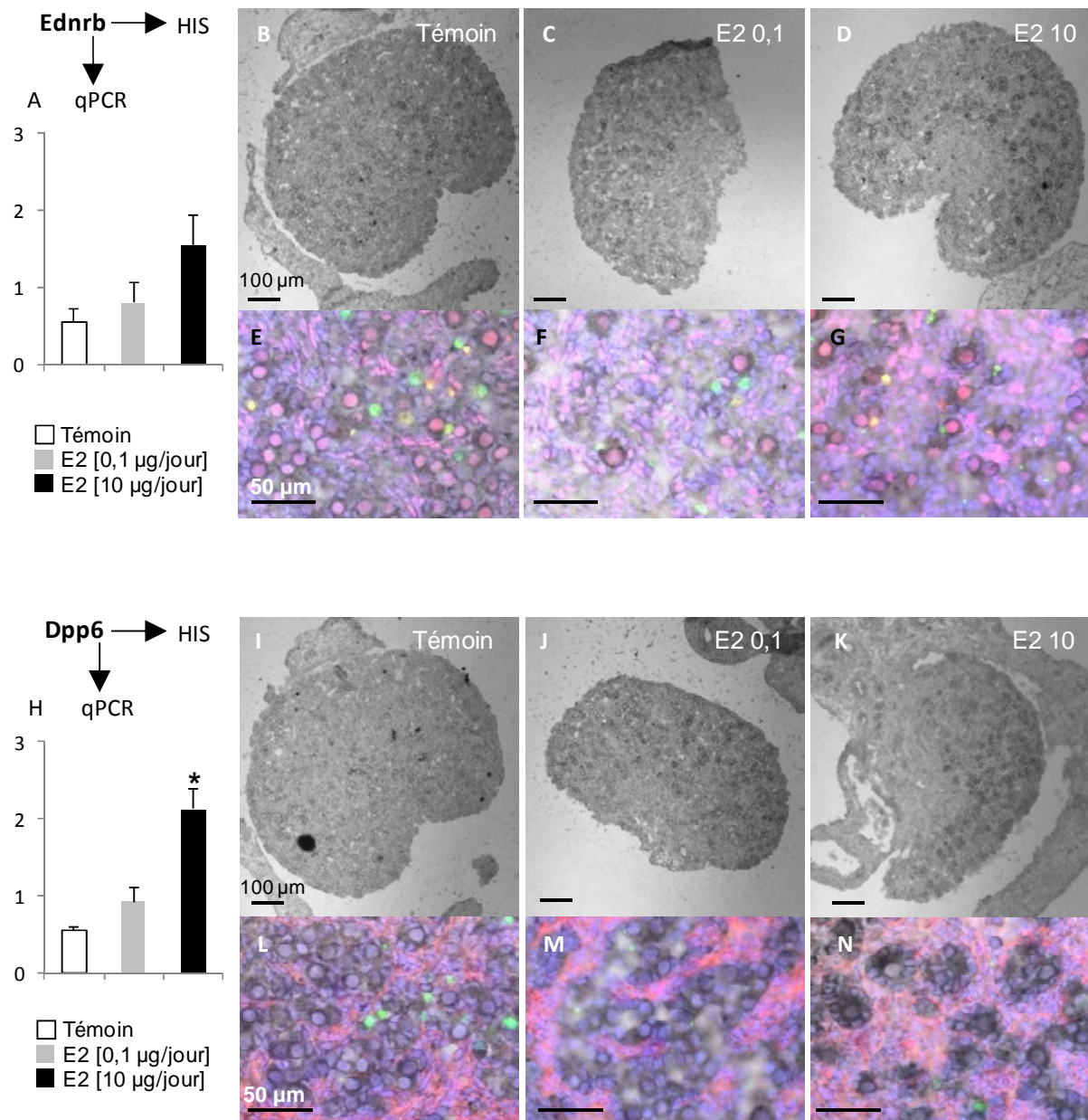


Figure 66 : Régulation de la mort cellulaire dans l'ovaire à 1 jpn.

A : Expression relative de Ednrb, impliqué dans la régulation de l'apoptose, mesurée en qPCR. **B-D** : Hybridation *in situ* de Ednrb sur des cryocoupes d'ovaires de 1 jpn témoin (B), traité à faible dose (C) et traité à forte dose (D). **E-G** : Gros grossissements des coupes présentées en B-D marquées à l'aide de PCNA (rose, marqueur de prolifération cellulaire) et TUNEL (vert, marqueur apoptotique). Ednrb est majoritairement exprimé dans les ovocytes.

H : Expression relative de Dpp6, impliqué dans la régulation de l'apoptose, mesurée en qPCR. **I-K** : Hybridation *in situ* de Dpp6 sur des cryocoupes d'ovaires de 1 jpn témoin (I), traité à faible dose (J) et traité à forte dose (K). **L-N** : Gros grossissements des coupes présentées en I-K marquées à l'aide de fibronectine (rose, marqueur des membranes basales) et TUNEL (vert, marqueur apoptotique). Dpp6 est exprimé dans les ovocytes et les cellules de la granulosa.

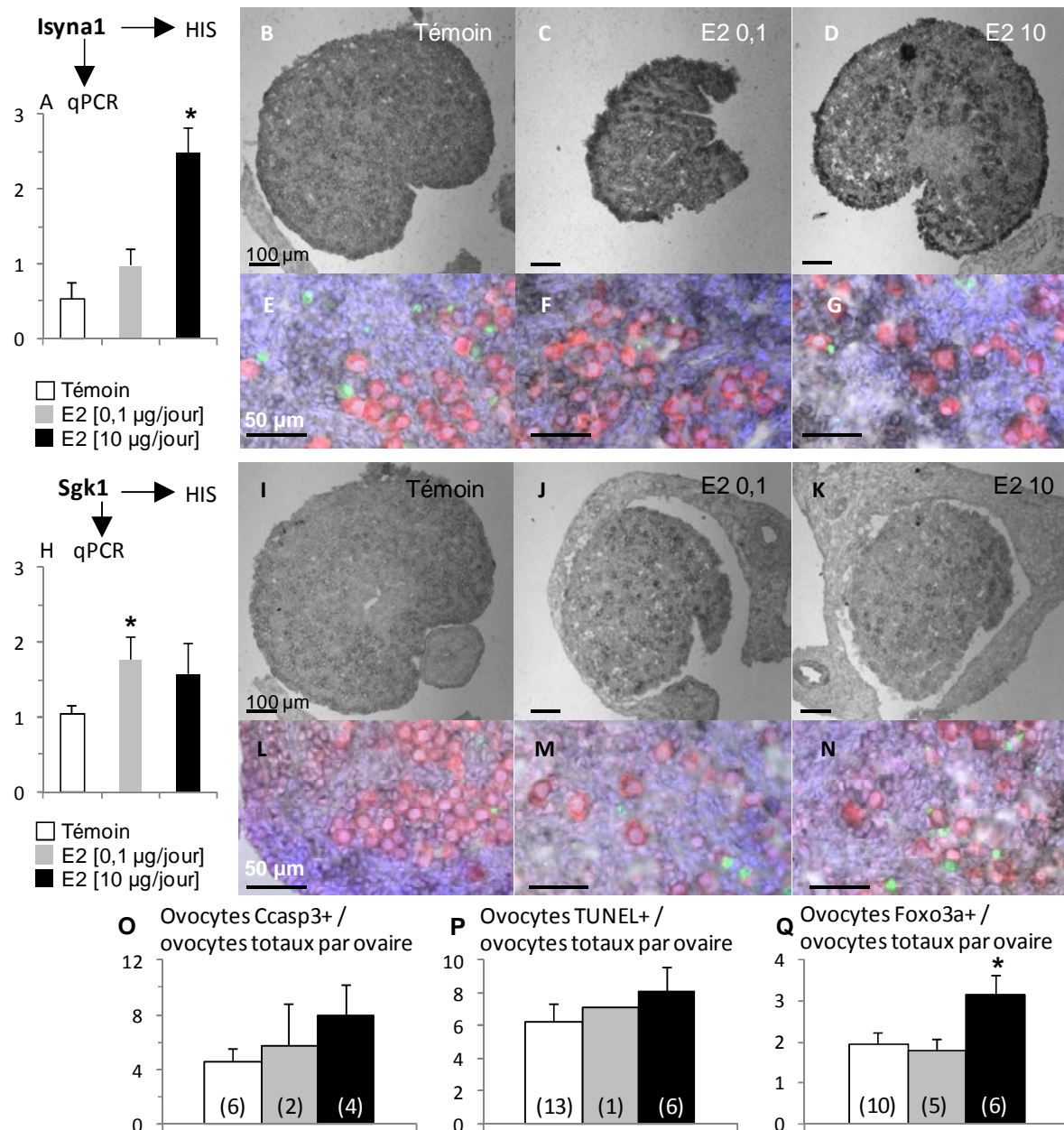


Figure 67 : Mort cellulaire via la voie Pi3K.

A : Expression relative de Isyna1 mesurée en qPCR. **B-D** : Hybridation *in situ* de Isyna1 sur des cryocoupes d'ovaires de 1 jpn témoin (**B**), traité à faible dose (**C**) et traité à forte dose (**D**). **E-G** : Gros grossissements des coupes présentées en **B-D** marquées à l'aide de Ybx2 (rose, marqueur ovocytaire) et TUNEL (vert, marqueur apoptotique). Isyna1 est majoritairement exprimé dans les cellules somatiques mais aussi dans les ovocytes. **H** : Expression relative de Sgk1 mesurée en qPCR. **I-K** : Hybridation *in situ* de Sgk1 sur des cryocoupes d'ovaires de 1 jpn témoin (**I**), traité à faible dose (**J**) et traité à forte dose (**K**). **L-N** : Gros grossissements des coupes présentées en **I-K** marquées à l'aide de Ddx4 (rose, marqueur des ovocytes) et TUNEL (vert, marqueur apoptotique). Sgk1 est exprimé dans les ovocytes et les cellules de la granulosa. **O-Q** : Comptage du nombre d'ovocytes marqués avec un indicateur de mort cellulaire (Casp3 – **O** ; TUNEL – **P** ; Foxo3a – **Q**) rapporté au nombre total d'ovocytes par ovaire. * : $p < 0,05$.

Discussion générale et Perspectives

I. Les contraintes liées au travail sur animal néonatal

Le travail sur des nouveau-nés impose de nombreuses contraintes techniques. En premier lieu, l'expérimentation dépend de l'heure de la naissance des animaux. La première injection de chacun des animaux a été réalisée 4 heures après la naissance afin de laisser à la mère le temps de finir sa mise bas et de prodiguer des soins à ses petits pour limiter les risques de rejet de nouveau-nés après manipulation par l'expérimentateur. Par ailleurs il est impossible de prévoir à l'avance le nombre de petits par portée à la naissance, le nombre de femelles par portée et la qualité des soins prodigués par la mère. Si plusieurs portées naissent à la même heure, il est possible de les équilibrer en répartissant les femelles nouveau-nées. En deuxième lieu, la petite taille des animaux à leur naissance conduit à la nécessité d'adapter les techniques d'injection et de prélèvement, de grouper plusieurs ovaires pour extraire une quantité suffisante d'ARN et de grouper les plasmas de plusieurs individus pour en obtenir une quantité suffisante pour les dosages hormonaux. Les expérimentations nécessitent alors un grand nombre d'animaux. En contrepartie les groupes sont réalisés de façon à réduire la grande variabilité interindividuelle en mélangeant des animaux issus de plusieurs portées différentes.

II. Les avantages de ce modèle in vivo

1. RÉPONSE MÉTABOLIQUE

La ratte comme modèle d'étude présente l'avantage de voir son histogénèse folliculaire se dérouler juste après la naissance, ce qui signifie que l'on peut traiter directement les animaux nouveau-nés. Ce traitement direct, plutôt que le traitement de la mère pendant la gestation, permet d'administrer à chaque animal une dose connue de substance dont la clairance est assurée uniquement par le nouveau-né. Ceci nous a permis d'évaluer les capacités de métabolisation de l'animal lui-même en réponse au traitement, point crucial dans l'étude de contaminants et souvent négligé lors de l'utilisation de modèles *in vitro*. Par ailleurs, le travail sur animal entier permet de tenir compte des éventuels effets de bioactivation. Ainsi il est possible que la molécule elle-même soit inoffensive mais que ses métabolites soient actifs. C'est le cas des métabolites d'E2 suite à l'action de Cyp1b1 (Zahid *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous avons démontré qu'en réponse à la répétition du traitement, l'animal développait ses capacités d'élimination afin d'en réduire l'impact. La quantité d'E2 atteignant les organes cibles n'était donc pas constante comme dans le cadre d'un système statique *in vitro* mais évolutive en fonction de la capacité de métabolisation / excrétion de l'animal comme en témoignent les dosages hormonaux effectués quotidiennement pendant la durée du traitement. L'étude intègre donc à la fois la réponse générale de l'organisme (métabolisation centrale assurée par le foie) et la défense locale mise en place au sein de l'organe d'intérêt : l'ovaire. La réponse métabolique hépatique a été étudiée non pas sur l'organe entier mais sur un fragment du lobe

hépatique principal malgré l'hétérogénéité connue de la distribution des enzymes de détoxification dans le tissu (Oinonen & Lindros, 1995 ; Liu *et al.*, 2005). Toutefois, pour limiter le biais d'étude introduit par l'utilisation d'un fragment hépatique et non de l'organe entier malgré cette compartimentation, le fragment utilisé a toujours été prélevé dans la même zone anatomique sur chacun des animaux. Cette étude -non exhaustive- a été évaluée par qPCR. Il s'agit donc d'une approche par gène candidat alors que le système de métabolisation des œstrogènes fait intervenir de nombreux acteurs. En outre, il convient de rappeler que la quantité d'ARNm, détectée par qPCR, ne reflète pas nécessairement l'activité de l'enzyme ciblée. Pour évaluer les voies majoritaires impliquées dans le métabolisme de E2 chez la ratte néonatale, on peut envisager de mesurer l'activité des différentes classes d'enzymes impliquées dans le métabolisme sur des fractions microsomales hépatiques. En effet, en ajoutant à ces microsomes le substrat connu d'une famille d'enzymes (par exemple la résorufine pour les Cyp1, du chlorodinitrobenzène pour les GST) on peut évaluer l'apparition d'un produit coloré dont la production résulte spécifiquement de l'activité de l'enzyme. Il est également possible de doser les métabolites excrétés dans les urines.

2. RÉPONSE PHYSIOPATHOLOGIQUE

Dans le cadre de la fonction reproductive, l'ovaire coopère notamment avec l'hypothalamus, l'hypophyse, l'oviducte et l'utérus, formant un système complexe en constante interaction. Il est donc difficile de déterminer avec exactitude la part de responsabilité de chacun des organes impliqués en cas de dysfonctionnement reproductif. L'ovaire est une cible directe des œstrogènes administrés en période néonatale (présence des récepteurs et effets précoces sur le nombre de cellules germinales). Dans cet organe, l'altération de la dynamique folliculaire visible chez l'adulte grâce aux comptages effectués à 8 mois (et présentés en figure 54) est suspectée de s'établir très tôt dans la vie de l'animal. Nous envisageons donc une quantification des follicules selon leur stade de développement en période néonatale (3 jpn ou 6 jpn) ainsi qu'en période juvénile (21 jpn) en fonction de la dose de traitement utilisée. Ces comptages, réalisables sur des coupes histologiques d'ovaires déjà collectés, fixés et coupés, nous permettraient de confirmer notre hypothèse selon laquelle la dynamique de recrutement est altérée par les 2 doses utilisées mais de façon différente.

Si notre étude a démontré que l'ovaire était une cible directe des œstrogènes administrés en période néonatale, les conséquences à long terme à forte dose résultent très probablement d'une atteinte globale du système reproducteur. Ainsi des souris adultes traitées avec du DES entre 0 et 4 jpn sont anovulatoires et stériles. L'ovulation est restaurée par une stimulation à l'hCG, confirmant l'atteinte centrale, mais le taux de gestation reste nul. La greffe d'ovaires traités sur des femelles témoins permet la naissance de petits contrairement à la greffe d'ovaires témoins sur des femelles traitées, confirmant l'atteinte générale du tractus génital (Halling & Forsberg, 1990). Cette atteinte locale de l'ovaire ou au contraire plus générale de tout l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique pourrait expliquer les différences de stock folliculaire constatées à l'âge adulte. Des cerveaux ont été prélevés sur des animaux entre 0 et 12 jpn. Ils pourraient permettre l'étude de l'ébauche hypothalamique, du

système kiss, des neurones à GnRH ou de la réceptivité à la GnRH des cellules gonadotropes hypophysaires.

D'autres études ont été menées sur la fonctionnalité du tractus génital suite à une œstrogénisation néonatale. Un traitement à la génistéine ne semble pas induire de perturbation du transport des œufs (obtenus après stimulation) dans l'oviducte (Jefferson *et al.*, 2009), bien que d'après notre étude cet organe soit lui aussi affecté par le traitement. Cette atteinte de l'oviducte, qui exprime abondamment Er α au moment du traitement (voir figure 2 article 1), est morphologiquement visible à 3 jpn (voir figure 57). L'oviducte traité à forte dose reste dans un état de relative immaturité puisqu'il tarde à acquérir sa morphologie fortement enroulée. Il est par ailleurs connu que le développement de cet organe est durablement altéré par un traitement néonatal avec de la génistéine (Jefferson *et al.*, 2011).

Outre l'oviducte, l'utérus est également une cible potentielle du traitement puisque cet organe porte des récepteurs des œstrogènes dès la naissance (Fishman *et al.*, 1996). Dans le cas de souris traitées avec de la génistéine, il est inapte à l'implantation (Jefferson *et al.*, 2009). Il semblerait que l'œstrogénisation précoce entraîne la perte de la réponse utérine correcte aux hormones stéroïdes, empêchant l'implantation embryonnaire (Varayoud *et al.*, 2011). Au cours de notre étude, le nombre de petits viables (c'est-à-dire en vie et en bonne santé à 3 jpn, ce qui implique les soins prodigués par la mère) chez les femelles traitées était plus faible que chez les femelles témoins, malheureusement les points d'implantation résiduels sur l'utérus des femelles n'ont pas été comptés pour savoir si le nombre d'implantations était également plus faible chez les femelles traitées ou si la perte de l'embryon survenait plus tardivement au cours de son développement, comme c'est le cas chez des rattes traitées avec du DES (Yamamoto *et al.*, 2003). L'utérus est d'autant plus susceptible d'être influencé par les traitements aux œstrogènes que ceux-ci interfèrent dans l'expression des récepteurs de la progestérone (voir partie *Résultats. III* ; Padilla-Banks *et al.*, 2006 ; Aldad *et al.*, 2011), autre hormone clé du fonctionnement utérin. Il serait donc intéressant d'étudier l'histologie de l'utérus (prolifération des cellules selon le cycle, expression des récepteurs des œstrogènes et de la progestérone) sur des coupes d'organes issus de femelles traitées à faible ou forte dose. Par ailleurs, la sénescence reproductive s'accompagne d'une augmentation de la teneur utérine en collagène (Schaub, 1964). Si l'on considère que les femelles traitées à la naissance présentent une sénescence reproductive précoce, il pourrait être envisagé d'évaluer par marquage immunohistochimique la teneur en collagène de leurs utérus.

III. Altération de la communication entre cellule germinale et cellules somatiques

L'ovocyte ne reçoit pas de vascularisation directe, il dépend des cellules somatiques qui l'entourent pour assurer sa nutrition. Pour faciliter la communication entre cellules somatiques et germinales, chacun de ces types cellulaires développe des prolongements en direction de l'autre. Ce mode de

communication par extension cytoplasmique a d'abord été décrit dans l'ovaire de ratte adulte (Bjorkman, 1962) puis chez la ratte néonatale, à 1 jpn, avant même la formation de la zone pellucide qui s'établit entre l'ovocyte et ses cellules de la granulosa associées (Anderson & Albertini, 1976). Les prolongements cytoplasmiques envoyés par les cellules somatiques peuvent établir des jonctions soit avec les microvillosités envoyées par l'ovocyte, soit avec la membrane ovocytaire (Anderson & Albertini, 1976). Ces connexions anatomiques ont aussi été décrites dans l'ovaire humain et s'établissent *in utero* au moment de la formation folliculaire, quand les ovocytes commencent à s'associer avec les cellules somatiques avant la formation de la zone pellucide (Gondos *et al.*, 1971 ; Motta & Makabe, 1982). Le fait que ces microvillosités régressent lorsque l'ovocyte entre en atresie indique leur grande importance dans la bonne santé ovocytaire (Devine *et al.*, 2000). Ces projections cytoplasmiques sont également observées sur les cellules hypophysaires de ratte et l'E2 en augmente la taille (Antakly *et al.*, 1980). Chez les femmes traitées par chimiothérapie, les microvillosités ovocytaires régressent mais cette régression est inhibée par un traitement par des œstrogènes (Familiari *et al.*, 1993). La privation d'E2 au cours du développement ovarien chez le babouin inhibe le développement des microvillosités ovocytaires (Zachos *et al.*, 2004). L'E2 a donc la capacité d'influer sur la mise en place et le maintien de ce support physique de communication entre les cellules germinales et somatiques. Ce dialogue intercellulaire joue un grand rôle dans la formation folliculaire (voies Notch2, Hahn *et al.*, 2005, Trombly *et al.*, 2009; Kit et Pi3K, Wang & Roy, 2004) or nous avons vu au cours de notre étude qu'il était modifié par les œstrogènes (voie Pi3K). L'altération du dialogue inter-cellulaire pourrait donc se jouer à la fois sur les plans chimique (voies de signalisation) et physique (développement des extensions cellulaires).

IV. Extension aux perturbateurs endocriniens

Si les effets induits par différents perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique sont semblables, il est probable que les mécanismes mis en jeu diffèrent malgré tout. Conduire la même étude que celle présentée dans ce manuscrit avec d'autres PEO en examinant les mêmes paramètres permettrait d'identifier d'éventuelles caractéristiques communes à tous. Ces caractéristiques pourraient par la suite servir de base pour établir une liste de critères d'alerte à prendre en compte notamment dans le cadre des procédures standardisées d'évaluation du risque lié aux substances ayant potentiellement une activité œstrogénique. Par exemple, l'étude transcriptomique a mis en lumière d'importantes modifications de l'expression de divers gènes au cours d'une fenêtre temporelle très sensible aux œstrogènes. La même étude transcriptomique réalisée avec du BPA, du DES (dont les effets délétères sur l'humain ne font aucun doute) ou de la génistéine permettrait de comparer la liste des gènes dont l'expression est modifiée avec la liste générée au cours de notre étude. Les enrichissements découverts (présentés en figure 60) appuient cette hypothèse de « signature transcriptomique » mais ils sont établis par AMEN en utilisant les données publiques issues d'organes différents à des âges différents. Générer des données utilisant des ovaires à 1 jpn

affinerait cette signature. Ce principe de signature rappelle celui de la QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) qui se base sur la structure des molécules pour en prédire les effets potentiels. Par exemple, les cycles à doubles liaisons peuvent être bioactivés en structures époxydes, potentiellement génotoxiques (Benigni & Bossa, 2006). Cette signature pourrait être utilisée pour tester la toxicité potentielle de diverses substances et notamment les substituts actuellement proposés pour remplacer les composants plastiques ayant une activité endocrine comme le BPA.

V. L'héritabilité des dommages liés à l'œstrogénisation néonatale

Nos données actuelles indiquent que l'E2 induit des dommages directs sur l'ADN des cellules ovariennes. Nous n'avons pas pour l'instant évalué avec précision la nature de ces dommages. Ainsi, la réparation des cassures double brins fait intervenir la protéine H2AX, ce qui n'est pas le cas de la réparation des cassures simple brin. Il est envisagé d'évaluer la proportion de cassures simple brin présentes sur l'ADN des cellules ovariennes par marquage immunohistochimique soit sur coupes histologiques soit sur des préparations d'ovaires dilacérés et étalés sur des lames de verre. Par ailleurs, il serait également intéressant de savoir si les ovocytes ont une période de sensibilité particulière à ces dommages. On sait qu'il existe des cassures double brin physiologiquement induites au cours du stade leptotène de la méiose. Il est possible que ce stade soit propice aux lésions de l'ADN ou encore que les lésions produites à ce stade soient plus rapidement réparées que des lésions qui surviendraient plus tardivement. Par exemple, au stade pachytène a lieu un point de contrôle de la qualité de l'ADN des ovocytes. Il serait donc intéressant de savoir si l'ADN peut être altéré après ce contrôle, lorsque l'ovocyte est entré en quiescence, et si les lésions induites deviennent alors persistantes voire transmissibles. Le suivi par qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN pourrait nous permettre de savoir si l'ovaire répare son ADN après la fenêtre physiologique de réparation liée à la méiose. La persistance des lésions de l'ADN pourrait être évaluée par un test des comètes réalisé chez l'animal prépubère. Le test des comètes présente cependant une lacune majeure : la lyse cellulaire rend impossible le double marquage qui permettrait de s'assurer que la cellule « comète » est un ovocyte et non une cellule somatique. Or le tri cellulaire est extrêmement difficile sur ce tissu. Le tri par FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*) nécessiterait soit un animal transgénique exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans ses ovocytes sous le contrôle d'un promoteur de gène spécifique de l'ovocyte, soit un anticorps spécifique des ovocytes. Mais cette spécificité se heurte à une autre lacune expérimentale : l'ovocyte perd parfois l'expression de certains de ses marqueurs spécifiques quand il s'engage dans l'apoptose, ce qui biaiserait le tri.

Compte tenu des lésions induites par le traitement sur la cellule germinale, certaines équipes se sont intéressées aux effets transgénérationnels des perturbateurs endocriniens. Ainsi, chez la souris, l'exposition (néonatale ou prénatale) des femelles entraîne une augmentation de l'incidence

d'adénocarcinomes vaginaux chez leurs descendantes (F2 ; Newbold *et al.*, 1998). Chez des souris non traitées issues de mères et de grand-mères traitées toute leur vie avec de la génistéine, la cyclicité semble altérée mais pas la fertilité (NIH, 2008a ; NIH, 2008b). Les souris femelles issues de mères traitées brièvement *in utero* avec du BPA présentent des anomalies morphologiques de l'utérus et des altérations épigénétiques (Hiyama *et al.*, 2011). La perturbation de la reprogrammation épigénétique ovocytaire par une exposition à du BPA entraîne l'altération de l'expression des gènes de l'embryon ainsi que l'expression des gènes dans le placenta (Susiarjo *et al.*, 2013). Le métoxychlore induit une hyperméthylation de loci appartenant à la séquence du promoteur de *Erβ* ou encore dans la séquence de *Pten*, régulateur de la voie *Pi3K/Akt* (Uzumcu *et al.*, 2012). La voie *Pi3K/Akt* est également altérée épigénétiquement par un traitement au DES (Bredfeldt *et al.*, 2010). Toutes ces données prouvent que les voies épigénétiques sont également à considérer au cours de l'étude des perturbateurs endocriniens et de leur influence sur la fonction reproductive. La détection des marques épigénétiques nécessite cependant des techniques qui n'ont pas été décrites dans ce manuscrit telles que le séquençage après traitement au bisulphite de sodium. Cette méthode permet la détection des sites méthylés. La méthylation protège le site méthylé (appartenant à des îlots CpG) de la conversion des Cytosines en Uraciles après traitement au bisulphite. Le séquençage permet ensuite, grâce à l'alignement de séquences sur la séquence de référence, de détecter les sites méthylés. On peut envisager sur notre modèle un traitement de 3 jours à partir de la naissance pour un séquençage à 3 jpn de gènes impliqués dans la voie des *Pi3K*, de gènes impliqués dans l'apoptose ou encore la méiose ainsi que de gènes soumis à empreinte, tels que *Igf2r*, *Lit1*, *Snrnp* ou *Zac1*. Pour s'affranchir du séquençage, il est également possible de dessiner des amorces de PCR comprenant des bases complémentaires des Cytosines sur les gènes cibles. Si une méthylation est apparue, le C sera changé en U et il n'y aura pas d'amplification. À l'inverse, des amorces portant le complémentaire de l'U permettront de détecter une déméthylation. Cette technique est appelée « PCR méthylation-spécifique ». Par ailleurs, des anticorps spécifiques d'évènements épigénétiques ont également été développés, permettant une étude immunohistochimique ou par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) à des âges différents pour tester la persistance des éventuelles modifications.

VI. Comparaison inter-espèces : extrapolation à l'Homme ?

Les troubles de la fertilité féminine (puberté précoce, irrégularité des cycles, endométriose sénescence ovarienne précoce, ovaires polykystiques) augmentent parallèlement avec le nombre de perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement (Crain *et al.*, 2008). Or on retrouve beaucoup de ces troubles dans les modèles animaux, notamment chez les rattes traitées juste après la naissance avec des œstrogènes ou xéno-œstrogènes.

1. VARIATIONS INTER-ESPÈCES : CAS DES RONGEURS

Parmi les modèles animaux les plus communs, les petits mammifères (et notamment les rongeurs) sont de loin les plus fréquemment utilisés. Mais l'œstrogénisation néonatale semble induire des effets contradictoires chez la ratte, la souris et le hamster.

	<i>Nombre d'ovocytes</i>	<i>Fragmentation des nids</i>	<i>Transition vers stade primaire</i>
Hamster	↗ Arrau <i>et al.</i> , 1983	→ ou ↗ Wang & Roy, 2007	
Souris	↗ Jefferson <i>et al.</i> , 2006 Pepling <i>et al.</i> , 2010 Karavan & Pepling, 2012 ↘ Lawson <i>et al.</i> , 2011	↘ Chen <i>et al.</i> , 2007b Iguchi <i>et al.</i> , 1986 Jefferson <i>et al.</i> , 2006 Karavan & Pepling, 2012 Kirigaya <i>et al.</i> , 2006	↗ Chao <i>et al.</i> , 2012 ↘ Karavan & Pepling, 2012 Zhang <i>et al.</i> , 2012b Kim <i>et al.</i> , 2009
Rat	↘ Kipp <i>et al.</i> , 2007 Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2008 Sotomayor-Zarate <i>et al.</i> , 2011 Chalmey <i>et al.</i> , 2013	↘ Kipp <i>et al.</i> , 2007 Losa <i>et al.</i> , 2011 Rodriguez <i>et al.</i> , 2010	↘ Ahn <i>et al.</i> , 2012 Kezele & Skinner, 2003 ↗ Rodriguez <i>et al.</i> , 2010 Yamamoto <i>et al.</i> , 2003

Compte tenu de l'utilisation au cours de ces études de doses différentes et même de composés à activité œstrogénique différents, il est possible que les apparentes contradictions entre les effets soient en partie liées à l'action différente des doses fortes et faibles. Cette divergence entre les effets des doses faibles et fortes, observée chez le hamster ou une dose dite « faible » accélère la fragmentation des nids ovocytaires mais ou une dose plus forte ne modifie pas cette fragmentation (Wang & Roy, 2007), est fréquemment rencontrée dans l'étude des perturbateurs endocriniens (Faber & Hughes, 1991, Almstrup *et al.*, 2002, Rubin & Soto, 2009, Adewale *et al.*, 2009). On peut également noter chez la souris des variations de sensibilité au traitement (pour un même composé et une même dose) en fonction de la souche utilisée (Pepling *et al.*, 2010).

2. VARIATIONS INTER-ESPÈCES : PETITS MAMMIFÈRES VERSUS GROS MAMMIFÈRES

Après avoir découvert que l'injection néonatale de stéroïdes induisait une infertilité chez le rongeur, certaines équipes ont essayé d'injecter des stéroïdes juste après la naissance à des génisses, des truies et des chiennes. Mais ce traitement n'a affecté ni la puberté ni la fonction de reproduction. Les auteurs font alors l'hypothèse qu'à la naissance ces animaux sont déjà trop matures (Zimbelman & Lauderdale, 1973). Ce sont toutes des espèces à formation folliculaire et différenciation hypothalamique *in utero*. Ça n'invalidé pas pour autant la théorie hormonale de la formation folliculaire. En effet, chez la vache, espèce à histogenèse folliculaire *in utero*, l'ovaire foetal synthétise

des œstrogènes (peut-être grâce à la coopération entre la glande surrénale et l'ovaire embryonnaire) et ce taux s'effondre au moment de la transition des follicules primordiaux vers le stade primaire.

De plus, l'œstrogénisation néonatale de brebis entraîne une accélération de la transition du stade « follicule primordial » à « primaire » à 30 jpn (Rivera *et al.*, 2011) suggérant une modification de la dynamique de recrutement folliculaire semblable à celle observée chez des rongeurs traités (voir tableau ci-dessus, colonne « transition vers le stade primaire »).

3. PRIMATES

Les primates d'élevage sont physiologiquement les modèles les plus proches de l'Homme, mais peu d'études concernant l'influence des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction sont menées sur ces espèces. Ainsi la privation d'œstrogènes au moment de la formation folliculaire chez le babouin engendre une diminution de la fragmentation des nids ovocytaires et une réduction du nombre de follicules primordiaux formés (Zachos *et al.*, 2003; Albrecht & Pepe, 2010). Ceci est cohérent avec les observations faites sur les souris privées d'œstrogènes (Britt *et al.*, 2004), démontrant que les modèles murins peuvent refléter des modèles de primates. Les études de Zachos et Albrecht ont été menées suite à la privation d'œstrogènes mais il y en a peu sur la surexposition de primates à des œstrogènes ou des substances dotées d'activité œstrogénique. Une autre étude, chez le singe rhésus, rapporte que l'exposition à du BPA réduit la fragmentation des nids ovocytaires et augmente la survenue de MOF (Hunt *et al.*, 2012). Chez des lémuriens, l'administration d'œstradiol affecte le ratio « follicules primordiaux / follicules primaires » (Kumar, 1968), comme dans le cas des rongeurs traités. Toutefois il n'est pas précisé si cette altération est liée à une modification de la survie folliculaire, de la fragmentation des nids ou de la dynamique de recrutement. Il n'y a pas d'informations sur les capacités reproductives de ces animaux.

4. DES MODÈLES DE LABORATOIRE À L'HOMME

Des dérivés de tissus humains sont utilisés *in vitro* pour étudier les perturbateurs endocriniens. Par exemple, la lignée cellulaire MCF-7 (issue d'une patiente atteinte d'un cancer du sein) est utilisée pour évaluer le potentiel œstrogénique de produits chimiques puisque ces cellules portent des récepteurs des œstrogènes et prolifèrent en présence d'œstrogènes (Brooks *et al.*, 1973). La lignée NCI-H295 (issue d'un corticosurrénalome humain, Gazdar *et al.*, 1990) exprime toutes les enzymes de la stéroïdogénèse et constitue donc un outil de choix pour comprendre comment un PE peut interférer dans la synthèse des stéroïdes sexuels. Cependant il n'y a pas de modèle *in vitro* disponible pour étudier la formation folliculaire suite à divers traitements. En effet, si la fonction et le développement testiculaires du fœtus humain peuvent être évalués *in vitro* en culture organotypique (Lambrot *et al.*, 2006 ; Mazaud-Guittot *et al.*, 2013) grâce à la récupération de testicules fœtaux après une Interruption Volontaire de Grossesse (IVG), cette technique est difficilement applicable à l'ovaire. En France, le délai légal pour une IVG est fixé à 12 semaines de grossesse, soit environ 5

semaines trop tôt pour évaluer la formation folliculaire après mise en culture des ovaires fœtaux. Ce délai n'est pas le même partout. Ainsi, il est de 24 semaines dans certains pays anglo-saxons, ce qui permet l'étude de la formation folliculaire humaine (Fowler *et al.*, 2011).

Les modèles les plus proches, physiologiquement, sont les modèles de primates non humains. Ils présentent cependant un certain nombre d'inconvénients rendant leur utilisation contraignante : coût élevé, contraintes techniques (animalerie, personnels), durée de vie longue et maturité sexuelle tardive ce qui rend difficile l'étude à long terme des fonctions reproductives. L'utilisation de rongeurs, bien que plus éloignés physiologiquement, présente malgré tout de nombreux avantages : coûts moins élevés, durée de vie plus réduite, maturité sexuelle rapide, facilité de manipulation.

A. Formation folliculaire et milieu endocrine

La formation folliculaire est un processus complexe dont le début et la fin sont difficilement détectables avec exactitude. Si le début est considéré comme la première fragmentation de nids aboutissant à la formation du premier follicule, la fin est plus délicate à définir. On ne peut considérer que la formation folliculaire est finie lorsqu'on n'observe plus de nids non fragmentés puisque dans de nombreuses espèces les MOF sont physiologiques. Je n'indiquerai donc ici que des approximations qui donnent cependant une estimation de la durée de ce phénomène de formation.

	<i>Formation folliculaire</i>	<i>Référence</i>
Ratte	0 à 3 jpn	Beaumont & Mandl, 1962
Souris	0 à 3 jpn	Pepling & Spradling, 2001
Hamster	7 jpn - ?	Weakley, 1967 ; Roy & Hughes, 1994
Vache	≈ 12 à 20 semaines de gestation	Fortune <i>et al.</i> , 2011
Brebis	≈ 75 à 100 jpc	Juengel <i>et al.</i> , 2002 ; Sawyer <i>et al.</i> , 2002
Singe rhésus	≈ 14 semaines de gestation à ?	Revue, Padmanabhan & Veiga-Lopez, 2011
Femme	≈ 17 à 26 semaines de grossesse	Revue, Hartshorne <i>et al.</i> , 2009

Le déroulement post-natal de la formation folliculaire murine présente certains avantages (évoqués dans la première partie de cette discussion) mais représente également un inconvénient majeur dans le cadre d'une étude sur le développement ovarien: la formation folliculaire humaine, celle des primates non-humains et des ruminants se déroule *in utero*. Ceci implique que l'environnement endocrine au moment de cette formation est lié à celui du fœtus mais aussi à celui de la mère et à la capacité de l'organisme maternel à protéger le fœtus des perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement.

Chez la ratte, le taux d'œstrogènes circulants diminue après la naissance. Or chez la femme, la formation folliculaire a lieu au moment où le taux circulant d'œstrogènes augmente (Levitz & Young, 1977). Ces œstrogènes ont pour fonction de participer à la synthèse de la progestérone et moduler la maturation de l'axe hypothalamo-hypophyso-adrénocortical fœtal (pour revue, Albrecht & Pepe, 2010). La synthèse de ces œstrogènes résulte de la coopération entre l'organisme maternel, le placenta (doté de plusieurs enzymes de la stéroïdogenèse) et le fœtus. Il existe un œstrogène spécifiquement produit en grande quantité au cours de la grossesse : l'estriol (E3). Son potentiel

œstrogénique est 100 fois plus faible que l'E2 et 10 fois plus faible que l'E1 mais il conserve une grande efficacité pour augmenter et réguler le flux sanguin utéroplacentaire nécessaire au développement fœtal (pour revue, Mesiano, 2009). L'utilisation d'E3 au lieu d'E2 au cours du développement pourrait être un moyen de protection du fœtus contre une imprégnation œstrogénique trop importante. Par ailleurs le fœtus lui-même développe sa propre protection contre les œstrogènes maternels : il possède une grande capacité de sulfoconjugaison des œstrogènes dans de multiples tissus (notamment foie, intestin, poumon et glande surrénale ; pour revue, Mesiano, 2009). Il met également en place la synthèse de protéines de liaison. L'alfa-fœtoprotéine (AFP) est une protéine synthétisée par le foie fœtal (humain ou murin) (Gitlin & Boesman, 1967). Si la capacité de l'AFP murine à se lier aux stéroïdes (et notamment aux œstrogènes) n'est pas débattue, celle de l'AFP humaine est controversée. Certaines études démontrent que l'AFP humaine est incapable de se lier à l'œstradiol (Nishi *et al.*, 1991 ; Swartz & Soloff, 1974), alors que d'autres démontrent le contraire (Uriel *et al.*, 1972 ; Vakharia & Mizejewski, 2000). Toutefois, l'AFP (murine ou humaine) possède une activité inhibitrice de croissance sur les cellules (d'origine murine ou humaine) qui se multiplient sous l'influence d'E2 (Soto & Sonnenschein, 1980 ; Vakharia & Mizejewski, 2000). Cette capacité serait due à la fois à la liaison à E2 mais aussi à la fixation de l'AFP sur les récepteurs des œstrogènes sans les activer (Vakharia & Mizejewski, 2000).

Chez l'homme, une élévation du taux d'AFP fœtale a été corrélée à la survenue de cryptorchidie (défaut de masculinisation fœtale par inhibition de la descente testiculaire, Boyd *et al.*, 2006). Cette dernière étude a conduit à l'hypothèse selon laquelle l'élévation de l'AFP serait un mécanisme de protection du fœtus contre les perturbateurs endocriniens mais que ce mécanisme serait saturable. Ceci est cohérent avec des observations chez des souris femelles : si le gène de l'AFP est invalidé, les troubles observés à l'âge adulte sont concordants avec ceux découlant d'une œstrogénisation néonatale au cours de la période de formation folliculaire et différenciation hypothalamique (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2008 ; voir « introduction ». I.3.A. iii). Il existe d'autres molécules capables de se lier aux œstrogènes. C'est le cas de l'albumine et de la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG). Ainsi, au cours d'une étude cas / contrôle sur la survenue de cryptorchidie, il a été démontré que la part d'œstrogènes non liés était plus importante chez les femmes enceintes dont le fils était cryptorchide (Bernstein *et al.*, 1988). Au cours de cette même étude, les auteurs ont établi que la SHBG assurait la plus grande part de liaison et que la part liée par l'albumine augmentait avec le taux d'œstrogènes mais cette augmentation était insuffisante pour protéger le fœtus.

B. Fertilité et cancérogenèse

Bisphénol A :

Chez les femmes sous traitement contre l'infertilité, le taux sérique de BPA est inversement corrélé au nombre d'ovocytes obtenus après stimulation ovarienne en vue d'une Fécondation *In Vitro* (Mok-Lin *et al.*, 2010). Le taux urinaire est également corrélé avec la survenue de défaut d'implantation

(Ehrlich *et al.*, 2012). Ces données sont cohérentes avec celles recueillies chez le rongeur (Varayoud *et al.*, 2011).

Diethylstilbestrol :

Cette molécule a été associée chez les femmes exposées *in utero* à une augmentation du risque d'avortement spontané et une réduction de la fertilité (Hoover *et al.*, 2011) tout comme les rattes traitées juste après la naissance (Ohta *et al.*, 2012). Au-delà des similitudes concernant la fertilité, la survenue d'adénocarcinome vaginal chez les jeunes filles exposées *in utero* (Herbst *et al.*, 1971) a également été observée chez la souris (Newbold *et al.*, 1998). Il apparaît donc que malgré les différences physiologiques, le modèle murin permet de reproduire les observations épidémiologiques et constitue un modèle pertinent pour étudier les mécanismes mis en jeu dans la survenue de ces anomalies.

Au cours de notre étude, nous n'avons pas relevé de tumeurs chez nos animaux traités bien que l'œstradiol soit un cancérigène connu (pour revue, Liehr, 2000). Toutefois l'étude a été interrompue lorsque les animaux ont atteint 8 mois, il est donc possible que ce sacrifice ait eu lieu trop tôt pour observer le développement de tumeurs.

C. Héritabilité

Compte tenu notamment de l'influence des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique sur la cellule germinale femelle, la question de l'héritabilité des dommages est de plus en plus abordée. Par exemple, l'exposition à du BPA entraîne des anomalies méiotiques dans les ovaires fœtaux humains mis en culture (Brieno-Enriquez *et al.*, 2011; Brieno-Enriquez *et al.*, 2012) ainsi que dans les ovaires de souris et de macaques (Lenie *et al.*, 2008 ; Susiarjo *et al.*, 2007 ; Hunt *et al.*, 2012). Or le BPA a également été corrélé à la survenue d'anomalies caryotypiques humaines (Yamada *et al.*, 2002). Ceci démontre que l'atteinte génotoxique maternelle peut être transmise à la génération suivante. La mise en place d'empreintes épigénétiques altérées, démontrée chez l'animal, est donc également fortement suspectée chez l'homme pour expliquer la survenue de diverses pathologies ainsi que des anomalies de la reproduction (pour revue, Alegria-Torres *et al.*, 2011 ; Mathers *et al.*, 2010).

D'après les études épidémiologiques, les filles issues de mères exposées elles-mêmes *in utero* à du DES n'atteignent pas la puberté précocement (Wilcox *et al.*, 1995) mais il serait possible que leur probabilité de développer un adénocarcinome soit plus élevée que parmi la population non exposée (Blatt *et al.*, 2003). Il n'y a encore que peu de cas mais ceci serait cohérent avec les résultats d'études menées chez la souris (Newbold *et al.*, 1998). La fertilité de ces femmes serait également altérée (Titus-Ernstoff *et al.*, 2006) tout comme celle des femmes dont la mère a été exposée *in utero* à un insecticide (DDT ; Cohn *et al.*, 2003). La transmissibilité des dommages liés à l'exposition à des perturbateurs endocriniens ne se fait pas seulement de mère en fille puisque les garçons issus de mères exposées *in utero* à du DES aurait un risque accru d'hypospadias (Kalfa *et al.*, 2011).

D. Complexité des expositions humaines : doses et voies d'exposition

Il semble cependant que les effets des œstrogènes sur la fonction de reproduction féminine soient liés à la dose reçue. Si certains événements relèvent de l'exposition ponctuelle à une dose très forte (comme ce fut le cas pour le DES), la plupart des expositions humaines ont lieu à faible dose mais de façon continue (via la nourriture, un environnement pollué ou dans un cadre professionnel). La dose sans effet (*No Observed Effect Level*) du 17 β -œstradiol a été déterminée et validée par le JECFA¹ réuni en 1999. Cette dose (10 μ g/kg/jour) correspond environ à la dose 0.1 μ g/jour utilisée au cours de notre étude.

Par ailleurs, la plupart des études prennent en compte et analysent les mécanismes d'action d'une seule molécule à la fois. Or notre environnement contient non seulement des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique de nature multiple mais aussi des PE à activité anti-œstrogénique, androgéniques, anti-androgéniques... dont les effets combinés peuvent différer de la somme des effets observés séparément (principes de chimioprotection ou au contraire de synergie, Jacobsen *et al.*, 2010). Plus important encore, le mélange de plusieurs molécules à des doses dites « sans effet » peut induire des effets délétères. Ceci a été démontré sur des perturbateurs endocriniens faiblement œstrogéniques (Silva *et al.*, 2002).

La voie majoritaire d'exposition des populations humaines à ces perturbateurs endocriniens est la voie orale (via l'alimentation). Toutefois il est possible d'être également exposé par voie respiratoire ou cutanée. La multiplicité des voies d'expositions et des composés présents dans l'environnement rend l'évaluation des risques liés aux perturbateurs endocriniens extrêmement complexe.

¹ JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO: Food and Agricultural Organization, WHO: World Health Organization.

Conclusion

Au cours de mon étude, j'ai démontré que le traitement de ratte par des œstrogènes entre leur naissance et 3 jours induisait une réduction dose-dépendante de leur nombre d'ovocytes. Bien que le traitement entrave le développement normal du système de détoxification hépatique et ovarien, l'animal est capable d'accroître ses capacités d'élimination du traitement. Ces capacités sont toutefois insuffisantes pour bloquer les effets des œstrogènes. Ceux-ci modifient notamment l'apoptose physiologiquement observée dans l'ovaire à cet âge. Cependant, l'ovaire conserve sa capacité à poursuivre son développement. La puberté est avancée à la fois à la dose forte et à une dose 100 fois plus faible mais seule la dose forte induit une altération des cycles estrus dès leur mise en place et une infertilité dès 5 mois. À la dose faible, les troubles semblent ne survenir que plus tardivement. À 8 mois, on constate que les 2 doses étudiées altèrent le recrutement cyclique folliculaire de façon très différente. Tandis que les femelles traitées à dose forte sont anovulatoires mais que leur stock folliculaire semble normal, les femelles traitées à dose faible ont un stock folliculaire drastiquement réduit évoquant une sénescence reproductive précoce d'origine ovarienne. L'étude mécanistique à 1 jpn a révélé que le traitement induit une altération du transcriptome dépendante de la dose ainsi que des lésions de l'ADN plus importantes à faible dose qu'à forte dose. Cependant, à faible dose l'ovaire répare ses lésions tandis qu'à forte dose, les ovocytes empruntent la voie de l'apoptose, expliquant la réduction de 40 % du stock d'ovocytes constatée à 3 jpn.

De façon plus générale, il est évident que les œstrogènes sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. S'ils semblent réguler différemment le développement ovarien précoce selon l'espèce, il n'en demeure pas moins que leur implication dans ce développement rend toute modification de l'homéostasie œstrogénique préjudiciable pour la fertilité du futur adulte. Une surdose ou une privation d'œstrogènes au moment de la formation folliculaire provoquent des anomalies durables chez toutes les espèces considérées. Beaucoup de pathologies humaines pour lesquelles on suspecte fortement les perturbateurs endocriniens grâce aux études épidémiologiques ont été reproduites sur des modèles animaux. Malgré les évidentes différences physiologiques entre la ratte et la femme, ce modèle permet l'étude mécanistique de la genèse des troubles humains observés. Le modèle rongeur est donc un outil pertinent pour la compréhension et la potentielle prédiction des effets des produits chimiques.

Références bibliographiques

- Abbott, D. H., L. E. Nicol, J. E. Levine, N. Xu, M. O. Goodarzi and D. A. Dumesic (2013). "Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome." Mol Cell Endocrinol **373**(1-2): 21-28.
- Abel, E. L., R. P. Lyon, T. K. Bammler, C. L. Verlinde, S. S. Lau, T. J. Monks and D. L. Eaton (2004). "Estradiol metabolites as isoform-specific inhibitors of human glutathione S-transferases." Chem Biol Interact **151**(1): 21-32.
- Adewale, H. B., W. N. Jefferson, R. R. Newbold and H. B. Patisaul (2009). "Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons." Biol Reprod **81**(4): 690-699.
- Ahima, R. S. (2011). "No Kiss1ng by leptin during puberty?" J Clin Invest **121**(1): 34-36.
- Ahmed, F. E. and R. B. Setlow (1979). "Saturation of DNA repair in mammalian cells." Photochem Photobiol **29**(5): 983-989.
- Ahn, H. J., B. S. An, E. M. Jung, H. Yang, K. C. Choi and E. B. Jeung (2012). "Parabens inhibit the early phase of folliculogenesis and steroidogenesis in the ovaries of neonatal rats." Mol Reprod Dev **79**(9): 626-636.
- Akanni, A. and Y. J. Abul-Hajj (1997). "Estrogen-nucleic acid adducts: reaction of 3,4-estrone-o-quinone radical anion with deoxyribonucleosides." Chem Res Toxicol **10**(7): 760-766.
- Akinola, L. A., M. Poutanen, R. Vihko and P. Vihko (1997). "Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats." Endocrinology **138**(7): 2886-2892.
- Akison, L. K. and R. L. Robker (2012). "The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction." Reprod Domest Anim **47** Suppl 4: 288-296.
- Albertini, D. F., C. M. Combelles, E. Benecchi and M. J. Carabatsos (2001). "Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development." Reproduction **121**(5): 647-653.
- Albrecht, E. D. and G. J. Pepe (2010). "Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy." Int J Dev Biol **54**(2-3): 397-408.
- Albrecht, K. H. and E. M. Eicher (2001). "Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor." Dev Biol **240**(1): 92-107.
- Aldad, T. S., N. Rahmani, C. Leranthe and H. S. Taylor (2011). "Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate." Fertil Steril **96**(1): 175-179.
- Alegria-Torres, J. A., A. Baccarelli and V. Bollati (2011). "Epigenetics and lifestyle." Epigenomics **3**(3): 267-277.
- Allegrucci, C., A. Thurston, E. Lucas and L. Young (2005). "Epigenetics and the germline." Reproduction **129**(2): 137-149.
- Almstrup, K., M. F. Fernandez, J. H. Petersen, N. Olea, N. E. Skakkebaek and H. Leffers (2002). "Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves." Environ Health Perspect **110**(8): 743-748.
- Alper, M. M., E. E. Jolly and P. R. Garner (1986). "Pregnancies after premature ovarian failure." Obstet Gynecol **67**(3 Suppl): 59S-62S.
- Alzieu, C. L., J. Sanjuan, J. P. Deltreil and M. Borel (1986). "Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies." Marine Pollution Bulletin **17**(11): 494-498.
- Ambler, D. R., E. J. Bieber and M. P. Diamond (2012). "Sexual function in elderly women: a review of current literature." Rev Obstet Gynecol **5**(1): 16-27.
- Anckaert, E., M. De Rycke and J. Smitz (2013). "Culture of oocytes and risk of imprinting defects." Hum Reprod Update **19**(1): 52-66.
- Anderson, E. and D. F. Albertini (1976). "Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary." J Cell Biol **71**(2): 680-686.

- Antakly, T., G. Pelletier, F. Zeytinoglu and F. Labrie (1980). "Changes of cell morphology and prolactin secretion induced by 2-Br-alpha-ergocryptine, estradiol, and thyrotropin-releasing hormone in rat anterior pituitary cells in culture." *J Cell Biol* **86**(2): 377-387.
- Anway, M. D., A. S. Cupp, M. Uzumcu and M. K. Skinner (2005). "Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility." *Science* **308**(5727): 1466-1469.
- Ara, T., Y. Nakamura, T. Egawa, T. Sugiyama, K. Abe, T. Kishimoto, Y. Matsui and T. Nagasawa (2003). "Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5319-5323.
- Arai, K. Y., K. Ohshima, G. Watanabe, K. Arai, K. Uehara and K. Taya (2002). "Dynamics of messenger RNAs encoding inhibin/activin subunits and follistatin in the ovary during the rat estrous cycle." *Biol Reprod* **66**(4): 1119-1126.
- Arendsen de Wolff-Exalto, E. and A. C. Groen-Klevant (1980). "Oocyte growth in the immature rat." *J Reprod Fertil* **59**(1): 187-192.
- Arrau, J., L. Roblero, M. Cury and R. Gonzalez (1983). "Effect of exogenous sex steroids upon the number of germ cells and the growth of foetal ovaries grafted under the kidney capsule of adult ovariectomized hamsters." *J Embryol Exp Morphol* **78**: 33-42.
- Asaoka, Y., H. Sakai, J. Sasaki, M. Goryo, T. Yanai, T. Masegi and K. Okada (2010). "Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats." *J Vet Med Sci* **72**(4): 471-479.
- Awoniyi, C. A., D. Roberts, D. N. Veeramachaneni, B. S. Hurst, K. E. Tucker and W. D. Schlaff (1998). "Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein." *Fertil Steril* **70**(3): 440-447.
- Baarends, W. M., J. T. Uilenbroek, P. Kramer, J. W. Hoogerbrugge, E. C. van Leeuwen, A. P. Themmen and J. A. Grootegoed (1995). "Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth." *Endocrinology* **136**(11): 4951-4962.
- Baltus, A. E., D. B. Menke, Y. C. Hu, M. L. Goodheart, A. E. Carpenter, D. G. de Rooij and D. C. Page (2006). "In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication." *Nat Genet* **38**(12): 1430-1434.
- Bandera, E. V., U. Chandran, B. Buckley, Y. Lin, S. Isukapalli, I. Marshall, M. King and H. Zarbl (2011). "Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls." *Sci Total Environ* **409**(24): 5221-5227.
- Baquedano, M. S., N. Saraco, E. Berensztejn, C. Pepe, M. Bianchini, E. Levy, J. Goni, M. A. Rivarola and A. Belgorosky (2007). "Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(6): 2215-2222.
- Barlow, C., M. Liyanage, P. B. Moens, M. Tarsounas, K. Nagashima, K. Brown, S. Rottinghaus, S. P. Jackson, D. Tagle, T. Ried and A. Wynshaw-Boris (1998). "Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I." *Development* **125**(20): 4007-4017.
- Bartek, J. and J. Lukas (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 238-245.
- Bateman, H. L. and H. B. Patisaul (2008). "Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus." *Neurotoxicology* **29**(6): 988-997.
- Beaumont, H. M. and A. M. Mandl (1962). "A quantitative and cytological study of oögonia and oocytes in the foetal and neonatal RAT." *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **155**: 557-579.
- Becedas, L. and M. Bengtson Ahlberg (1995). "Hormonal influences of detoxication in the rat ovary on enzymes in comparison with the liver." *Biochem Pharmacol* **49**(4): 503-509.
- Beck-Peccoz, P. and L. Persani (2006). "Premature ovarian failure." *Orphanet J Rare Dis* **1**: 9.

- Becker, J. B., A. P. Arnold, K. J. Berkley, J. D. Blaustein, L. A. Eckel, E. Hampson, J. P. Herman, S. Marts, W. Sadee, M. Steiner, J. Taylor and E. Young (2005). "Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior." Endocrinology **146**(4): 1650-1673.
- Benbrook, C. M. (2002). "Organochlorine residues pose surprisingly high dietary risks." J Epidemiol Community Health **56**(11): 822-823.
- Benigni, R. and C. Bossa (2006). "Structural Alerts of Mutagens and Carcinogens." Current Computer-Aided Drug Design **2**(2): 169-176.
- Bennetts, H. W., E. J. Underwood and F. L. Shier (1946). "A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia." Aust Vet J **22**: 2-12.
- Bergman, M. D., B. S. Schachter, K. Karelus, E. P. Combatsiaris, T. Garcia and J. F. Nelson (1992). "Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol." Endocrinology **130**(4): 1923-1930.
- Bern, H. A., K. T. Mills and L. A. Jones (1983). "Critical period for neonatal estrogen exposure in occurrence of mammary gland abnormalities in adult mice." Proc Soc Exp Biol Med **172**(2): 239-242.
- Bernstein, L., M. C. Pike, R. H. Depue, R. K. Ross, J. W. Moore and B. E. Henderson (1988). "Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case-control study." Br J Cancer **58**(3): 379-381.
- Bertolasio, J., S. Fyfe, B. W. Snyder and A. M. Davis (2011). "Neonatal injections of methoxychlor decrease adult rat female reproductive behavior." Neurotoxicology **32**(6): 809-813.
- Bianco, N. R., G. Perry, M. A. Smith, D. J. Templeton and M. M. Montano (2003). "Functional implications of antiestrogen induction of quinone reductase: inhibition of estrogen-induced deoxyribonucleic acid damage." Mol Endocrinol **17**(7): 1344-1355.
- Biason-Lauber, A. (2010). "Control of sex development." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **24**(2): 163-186.
- Bilezikjian, L. M., A. L. Blount, A. M. Leal, C. J. Donaldson, W. H. Fischer and W. W. Vale (2004). "Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin." Mol Cell Endocrinol **225**(1-2): 29-36.
- Birk, O. S., D. E. Casiano, C. A. Wassif, T. Cogliati, L. Zhao, Y. Zhao, A. Grinberg, S. Huang, J. A. Kreidberg, K. L. Parker, F. D. Porter and H. Westphal (2000). "The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation." Nature **403**(6772): 909-913.
- Bjersing, L. and S. Cajander (1974). "Ovulation and the mechanism of follicle rupture. IV. Ultrastructure of membrana granulosa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation." Cell Tissue Res **153**(1): 1-14.
- Bjorkman, N. (1962). "A study of the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary." Acta Anat (Basel) **51**: 125-147.
- Bjornstrom, L. and M. Sjoberg (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." Mol Endocrinol **19**(4): 833-842.
- Blanchard, R. L., R. R. Freimuth, J. Buck, R. M. Weinshilboum and M. W. Coughtrie (2004). "A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily." Pharmacogenetics **14**(3): 199-211.
- Blatt, J., L. Van Le, T. Weiner and S. Sailer (2003). "Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol." J Pediatr Hematol Oncol **25**(8): 635-636.
- Bouvier, G., N. Seta, A. Vigouroux-Villard, O. Blanchard and I. Momas (2005). "Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **8**(6): 485-512.
- Bowles, J., D. Knight, C. Smith, D. Wilhelm, J. Richman, S. Mamiya, K. Yashiro, K. Chawengsaksophak, M. J. Wilson, J. Rossant, H. Hamada and P. Koopman (2006). "Retinoid signaling determines germ cell fate in mice." Science **312**(5773): 596-600.
- Boyd, H. A., C. Myrup, J. Wohlfahrt, T. Westergaard, B. Norgaard-Pedersen and M. Melbye (2006). "Maternal serum alpha-fetoprotein level during pregnancy and isolated cryptorchidism in male offspring." Am J Epidemiol **164**(5): 478-486.

- Branham, W. S., D. R. Zehr, J. J. Chen and D. M. Sheehan (1988). "Uterine abnormalities in rats exposed neonatally to diethylstilbestrol, ethynylestradiol, or clomiphene citrate." Toxicology **51**(2-3): 201-212.
- Braniste, V., A. Jouault, E. Gaultier, A. Polizzi, C. Buisson-Brenac, M. Leveque, P. G. Martin, V. Theodorou, J. Fioramonti and E. Houdeau (2010). "Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 448-453.
- Bredfeldt, T. G., K. L. Greathouse, S. H. Safe, M. C. Hung, M. T. Bedford and C. L. Walker (2010). "Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT." Mol Endocrinol **24**(5): 993-1006.
- Bresell, A., R. Weinander, G. Lundqvist, H. Raza, M. Shimoji, T. H. Sun, L. Balk, R. Wiklund, J. Eriksson, C. Jansson, B. Persson, P. J. Jakobsson and R. Morgenstern (2005). "Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily." FEBS J **272**(7): 1688-1703.
- Brieno-Enriquez, M. A., R. Reig-Viader, L. Cabero, N. Toran, F. Martinez, I. Roig and M. Garcia Caldes (2012). "Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro." Mol Hum Reprod **18**(4): 171-183.
- Brieno-Enriquez, M. A., P. Robles, N. Camats-Tarruella, R. Garcia-Cruz, I. Roig, L. Cabero, F. Martinez and M. G. Caldes (2011). "Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development." Hum Reprod **26**(10): 2807-2818.
- Bristol-Gould, S. K., P. K. Kreeger, C. G. Selkirk, S. M. Kilen, R. W. Cook, J. L. Kipp, L. D. Shea, K. E. Mayo and T. K. Woodruff (2006). "Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool." Dev Biol **298**(1): 132-148.
- Britt, K. L., P. K. Saunders, S. J. McPherson, M. L. Misso, E. R. Simpson and J. K. Findlay (2004). "Estrogen actions on follicle formation and early follicle development." Biol Reprod **71**(5): 1712-1723.
- Brock, B. J. and M. R. Waterman (1999). "Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species." Biochemistry **38**(5): 1598-1606.
- Broekmans, F. J., M. R. Soules and B. C. Fauser (2009). "Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences." Endocr Rev **30**(5): 465-493.
- Brooks, S. C., E. R. Locke and H. D. Soule (1973). "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma." J Biol Chem **248**(17): 6251-6253.
- Brunet, A., J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings and M. E. Greenberg (2001). "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)." Mol Cell Biol **21**(3): 952-965.
- Burgoyne, P. S. and T. G. Baker (1984). "Meiotic pairing and gametogenic failure." Symp Soc Exp Biol **38**: 349-362.
- Burlington, H. and V. F. Lindeman (1950). "Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels." Proc Soc Exp Biol Med **74**(1): 48-51.
- Bussmann, U. A., L. E. Bussmann and J. L. Baranao (2006). "An aryl hydrocarbon receptor agonist amplifies the mitogenic actions of estradiol in granulosa cells: evidence of involvement of the cognate receptors." Biol Reprod **74**(2): 417-426.
- Butcher, R. L. (1985). "Effect of reduced ovarian tissue on cyclicity, basal hormonal levels and follicular development in old rats." Biol Reprod **32**(2): 315-321.
- Butera, P. C. (2010). "Estradiol and the control of food intake." Physiol Behav **99**(2): 175-180.
- Butler, L. and N. Santoro (2011). "The reproductive endocrinology of the menopausal transition." Steroids **76**(7): 627-635.
- Byers, M., G. G. Kuiper, J. A. Gustafsson and O. K. Park-Sarge (1997). "Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins." Mol Endocrinol **11**(2): 172-182.
- Byskov, A. G. and S. Lintern-Moore (1973). "Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii." J Anat **116**(Pt 2): 207-217.

- Cabaton, N. J., P. R. Wadia, B. S. Rubin, D. Zalko, C. M. Schaeberle, M. H. Askenase, J. L. Gadbois, A. P. Tharp, G. S. Whitt, C. Sonnenschein and A. M. Soto (2011). "Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice." *Environ Health Perspect* **119**(4): 547-552.
- Cao, J., J. A. Mickens, K. A. McCaffrey, S. M. Leyrer and H. B. Patisaul (2012). "Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus." *Neurotoxicology* **33**(1): 23-36.
- Carlone, D. L. and J. S. Richards (1997). "Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells." *Mol Endocrinol* **11**(3): 292-304.
- Carpenter, A. T. (1979). "Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*." *Chromosoma* **75**(3): 259-292.
- Carreau, S., C. Bois, L. Zanatta, F. R. Silva, H. Bouraima-Lelong and C. Delalande (2011). "Estrogen signaling in testicular cells." *Life Sci* **89**(15-16): 584-587.
- Castellano, J. M., M. Gaytan, J. Roa, E. Vigo, V. M. Navarro, C. Bellido, C. Dieguez, E. Aguilar, J. E. Sanchez-Criado, A. Pellicer, L. Pinilla, F. Gaytan and M. Tena-Sempere (2006). "Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?" *Endocrinology* **147**(10): 4852-4862.
- Castrillon, D. H., L. Miao, R. Kollipara, J. W. Horner and R. A. DePinho (2003). "Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a." *Science* **301**(5630): 215-218.
- Cavalieri, E., K. Frenkel, J. G. Liehr, E. Rogan and D. Roy (2000). "Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations." *J Natl Cancer Inst Monogr*(27): 75-93.
- Cavalieri, E. L., D. E. Stack, P. D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. L. Johansson, K. D. Patil, M. L. Gross, J. K. Gooden, R. Ramanathan, R. L. Cerny and E. G. Rogan (1997). "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10937-10942.
- Cecconi, S., A. Mauro, V. Cellini and F. Patacchiola (2012). "The role of Akt signalling in the mammalian ovary." *Int J Dev Biol* **56**(10-12): 809-817.
- Cemeli, E. and D. Anderson (2011). "Mechanistic Investigation of ROS-Induced DNA Damage by Oestrogenic Compounds in Lymphocytes and Sperm Using the Comet Assay." *Int J Mol Sci* **12**(5): 2783-2796.
- Chalmel, F. and M. Primig (2008). "The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology." *BMC Bioinformatics* **9**: 86.
- Chalmey, C., F. Giton, F. Chalmel, J. Fiet, B. Jegou and S. Mazaud-Guittot (2013). "Systemic compensatory response to neonatal estradiol exposure does not prevent depletion of the oocyte pool in the rat." *PLoS One* **8**(12): e82175.
- Chao, H. H., X. F. Zhang, B. Chen, B. Pan, L. J. Zhang, L. Li, X. F. Sun, Q. H. Shi and W. Shen (2012). "Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway." *Histochem Cell Biol* **137**(2): 249-259.
- Chavalmane, A. K., P. Comeglio, A. Morelli, S. Filippi, B. Fibbi, L. Vignozzi, E. Sarchielli, M. Marchetta, P. Failli, P. Sandner, F. Saad, M. Gacci, G. B. Vannelli and M. Maggi (2010). "Sex steroid receptors in male human bladder: expression and biological function." *J Sex Med* **7**(8): 2698-2713.
- Chehab, F. F., M. E. Lim and R. Lu (1996). "Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin." *Nat Genet* **12**(3): 318-320.
- Chehab, F. F., K. Mounzih, R. Lu and M. E. Lim (1997). "Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin." *Science* **275**(5296): 88-90.
- Chen, J., K. C. Ahn, N. A. Gee, S. J. Gee, B. D. Hammock and B. L. Lasley (2007a). "Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products." *Toxicol Appl Pharmacol* **221**(3): 278-284.

- Chen, Y., K. Breen and M. E. Pepling (2009). "Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary." J Endocrinol **202**(3): 407-417.
- Chen, Y., C. Huang, T. Zhou, S. Zhang and G. Chen (2010). "Biochanin A induction of sulfotransferases in rats." J Biochem Mol Toxicol **24**(2): 102-114.
- Chen, Y., W. N. Jefferson, R. R. Newbold, E. Padilla-Banks and M. E. Pepling (2007b). "Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo." Endocrinology **148**(8): 3580-3590.
- Cheng, X., J. Maher, H. Lu and C. D. Klaassen (2006). "Endocrine regulation of gender-divergent mouse organic anion-transporting polypeptide (Oatp) expression." Mol Pharmacol **70**(4): 1291-1297.
- Cho, Y. M., H. F. Pu, W. J. Huang, L. T. Ho, S. W. Wang and P. S. Wang (2011). "Role of serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 in regulating torsion-induced apoptosis in rats." Int J Androl **34**(4): 379-389.
- Choi, E. J., C. M. Ha, J. Choi, S. S. Kang, W. S. Choi, S. K. Park, K. Kim and B. J. Lee (2001). "Low-density cDNA array-coupled to PCR differential display identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus." Brain Res Mol Brain Res **97**(2): 115-128.
- Choudhry, M. A. and I. H. Chaudry (2008). "17beta-Estradiol: a novel hormone for improving immune and cardiovascular responses following trauma-hemorrhage." J Leukoc Biol **83**(3): 518-522.
- Chrzanowska, K. H., M. Szarras-Czapnik, M. Gajdulewicz, M. A. Kalina, M. Gajtko-Metera, M. Walewska-Wolf, J. Szufladowicz-Wozniak, H. Rysiewski, H. Gregorek, B. Cukrowska, M. Syczewska, D. Piekutowska-Abramczuk, R. Janas and M. Krajewska-Walasek (2010). "High prevalence of primary ovarian insufficiency in girls and young women with Nijmegen breakage syndrome: evidence from a longitudinal study." J Clin Endocrinol Metab **95**(7): 3133-3140.
- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.
- Clarkson, J. and A. E. Herbison (2006). "Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **147**(12): 5817-5825.
- Cohn, B. A., P. M. Cirillo, M. S. Wolff, P. J. Schwingl, R. D. Cohen, R. I. Sholtz, A. Ferrara, R. E. Christianson, B. J. van den Berg and P. K. Siiteri (2003). "DDT and DDE exposure in mothers and time to pregnancy in daughters." Lancet **361**(9376): 2205-2206.
- Conde-Perezprina, J. C., M. A. Leon-Galvan and M. Konigsberg (2012). "DNA mismatch repair system: repercussions in cellular homeostasis and relationship with aging." Oxid Med Cell Longev **2012**: 728430.
- Connelly, J. C. and D. R. Leach (1996). "The sbcC and sbcD genes of Escherichia coli encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination." Genes Cells **1**(3): 285-291.
- Cook, P. R., I. A. Brazell and E. Jost (1976). "Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA." J Cell Sci **22**(2): 303-324.
- Cooper, R. L., P. M. Conn and R. F. Walker (1980). "Characterization of the LH surge in middle-aged female rats." Biol Reprod **23**(3): 611-615.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." Science **294**(5547): 1713-1716.
- Costoff, A. and V. B. Mahesh (1975). "Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women." J Am Geriatr Soc **23**(5): 193-196.
- Coucovanis, E. C., S. W. Sherwood, C. Carswell-Crumpton, E. G. Spack and P. P. Jones (1993). "Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis." Exp Cell Res **209**(2): 238-247.

- Couse, J. F., S. C. Hewitt, D. O. Bunch, M. Sar, V. R. Walker, B. J. Davis and K. S. Korach (1999). "Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta." Science **286**(5448): 2328-2331.
- Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" Endocr Rev **20**(3): 358-417.
- Couse, J. F., M. M. Yates, B. J. Deroo and K. S. Korach (2005). "Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins." Endocrinology **146**(8): 3247-3262.
- Couse, J. F., M. M. Yates, V. R. Walker and K. S. Korach (2003). "Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta." Mol Endocrinol **17**(6): 1039-1053.
- Crain, D. A., S. J. Janssen, T. M. Edwards, J. Heindel, S. M. Ho, P. Hunt, T. Iguchi, A. Juul, J. A. McLachlan, J. Schwartz, N. Skakkebaek, A. M. Soto, S. Swan, C. Walker, T. K. Woodruff, T. J. Woodruff, L. C. Giudice and L. J. Guillette, Jr. (2008). "Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing." Fertil Steril **90**(4): 911-940.
- Cruz, G., R. Barra, D. Gonzalez, R. Sotomayor-Zarate and H. E. Lara (2012). "Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats." Fertil Steril **98**(5): 1283-1290.
- Csaba, G., O. Dobozy and J. Dallo (1986). "Influence of neonatal steroid (diethylstilbestrol, allylestrenol) treatment on the sexual behaviour of the adult rat." Med Biol **64**(4): 193-195.
- Cui, J. Y., S. Choudhuri, T. R. Knight and C. D. Klaassen (2010). "Genetic and epigenetic regulation and expression signatures of glutathione S-transferases in developing mouse liver." Toxicol Sci **116**(1): 32-43.
- Curry, T. E., Jr. and K. G. Osteen (2003). "The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle." Endocr Rev **24**(4): 428-465.
- Cutolo, M., S. Capellino, A. Sulli, B. Seriola, M. E. Secchi, B. Villaggio and R. H. Straub (2006). "Estrogens and autoimmune diseases." Ann N Y Acad Sci **1089**: 538-547.
- D'Amico, F., E. Skarmoutsou and F. Stivala (2009). "State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry." J Immunol Methods **341**(1-2): 1-18.
- d'Anglemont de Tassigny, X. and W. H. Colledge (2010). "The role of kisspeptin signaling in reproduction." Physiology (Bethesda) **25**(4): 207-217.
- Darblade, B., C. Pendaries, A. Krust, S. Dupont, M. J. Fouque, J. Rami, P. Chambon, F. Bayard and J. F. Arnal (2002). "Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor." Circ Res **90**(4): 413-419.
- Davies, M. J. and R. J. Norman (2002). "Programming and reproductive functioning." Trends Endocrinol Metab **13**(9): 386-392.
- De Felici, M., F. G. Klinger, D. Farini, M. L. Scalfaferri, S. Iona and M. Lobascio (2005). "Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death." Reprod Biomed Online **10**(2): 182-191.
- de Roux, N., E. Genin, J. C. Carel, F. Matsuda, J. L. Chaussain and E. Milgrom (2003). "Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10972-10976.
- De Vos, M., P. Devroey and B. C. Fauser (2010). "Primary ovarian insufficiency." Lancet **376**(9744): 911-921.
- de Zwart, L., M. Scholten, J. G. Monbaliu, P. P. Annaert, J. M. Van Houdt, I. Van den Wyngaert, L. M. De Schaepdrijver, G. P. Bailey, T. P. Coogan, W. C. Coussement and G. S. Mannens (2008). "The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat." Reprod Toxicol **26**(3-4): 220-230.

- Deb, S., J. K. Tai, G. S. Leung, T. K. Chang and S. M. Bandiera (2011). "Estradiol-mediated suppression of CYP11B1 expression in mouse MA-10 Leydig cells is independent of protein kinase A and estrogen receptor." *Mol Cell Biochem* **358**(1-2): 387-395.
- Demeestere, I., A. K. Streiff, J. Suzuki, S. Al-Khabouri, E. Mahrous, S. L. Tan and H. J. Clarke (2012). "Follicle-stimulating hormone accelerates mouse oocyte development in vivo." *Biol Reprod* **87**(1): 3, 1-11.
- Desdoits-Lethimonier, C., O. Albert, B. Le Bizec, E. Perdu, D. Zalko, F. Courant, L. Lesne, F. Guille, N. Dejucq-Rainsford and B. Jegou (2012). "Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates." *Hum Reprod* **27**(5): 1451-1459.
- Desroziers, E., J. D. Mikkelsen, A. Duittoz and I. Franceschini (2012). "Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region-specific manner across rat postnatal development." *J Neuroendocrinol* **24**(8): 1154-1165.
- Devine, P. J., C. M. Payne, M. K. McCuskey and P. B. Hoyer (2000). "Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles." *Biol Reprod* **63**(5): 1245-1252.
- Dewailly, D., H. Gronier, E. Poncelet, G. Robin, M. Leroy, P. Pigny, A. Duhamel and S. Catteau-Jonard (2011). "Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries." *Hum Reprod* **26**(11): 3123-3129.
- Di Giacomo, M., M. Barchi, F. Baudat, W. Edelmann, S. Keeney and M. Jasin (2005). "Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 737-742.
- Dianov, G. L. and U. Hubscher (2013). "Mammalian base excision repair: the forgotten archangel." *Nucleic Acids Res* **41**(6): 3483-3490.
- Dieckmann, W. J., M. E. Davis, L. M. Rynkiewicz and R. E. Pottinger (1953). "Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value?" *Am J Obstet Gynecol* **66**(5): 1062-1081.
- Dierich, A., M. R. Sairam, L. Monaco, G. M. Fimia, A. Gansmuller, M. LeMeur and P. Sassone-Corsi (1998). "Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13612-13617.
- Dietrich, A. K., G. I. Humphreys and A. M. Nardulli (2013). "17beta-Estradiol increases expression of the oxidative stress response and DNA repair protein apurinic endonuclease (Ape1) in the cerebral cortex of female mice following hypoxia." *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Dissen, G. A., C. Garcia-Rudaz and S. R. Ojeda (2009). "Role of neurotrophic factors in early ovarian development." *Semin Reprod Med* **27**(1): 24-31.
- Dorfman, M. D., B. Kerr, C. Garcia-Rudaz, A. H. Paredes, G. A. Dissen and S. R. Ojeda (2011). "Neurotrophins acting via TRKB receptors activate the JAGGED1-NOTCH2 cell-cell communication pathway to facilitate early ovarian development." *Endocrinology* **152**(12): 5005-5016.
- Driancourt, M. A. (2001). "Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction." *Theriogenology* **55**(6): 1211-1239.
- Drummond, A. E., M. Dyson, E. Thean, N. P. Groome, D. M. Robertson and J. K. Findlay (2000). "Temporal and hormonal regulation of inhibin protein and subunit mRNA expression by post-natal and immature rat ovaries." *J Endocrinol* **166**(2): 339-354.
- Dumortier, A., A. Wilson, H. R. MacDonald and F. Radtke (2005). "Paradigms of notch signaling in mammals." *Int J Hematol* **82**(4): 277-284.
- Dupont, S., A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon and M. Mark (2000). "Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes." *Development* **127**(19): 4277-4291.
- Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, P. Kramer, B. Karels, H. A. Ingraham, M. W. Nachtigal, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen (2002). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." *Endocrinology* **143**(3): 1076-1084.

- Durlinger, A. L., P. Kramer, B. Karels, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." *Endocrinology* **140**(12): 5789-5796.
- Duty, S. M., K. Mendonca, R. Hauser, A. M. Calafat, X. Ye, J. D. Meeker, R. Ackerman, J. Cullinane, J. Faller and S. Ringer (2013). "Potential sources of bisphenol A in the neonatal intensive care unit." *Pediatrics* **131**(3): 483-489.
- Edelmann, W., P. E. Cohen, M. Kane, K. Lau, B. Morrow, S. Bennett, A. Umar, T. Kunkel, G. Cattoretti, R. Chaganti, J. W. Pollard, R. D. Kolodner and R. Kucherlapati (1996). "Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice." *Cell* **85**(7): 1125-1134.
- Ehrlich, S., P. L. Williams, S. A. Missmer, J. A. Flaws, K. F. Berry, A. M. Calafat, X. Ye, J. C. Petrozza, D. Wright and R. Hauser (2012). "Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization." *Environ Health Perspect* **120**(7): 978-983.
- Eichenlaub-Ritter, U., E. Vogt, S. Cukurcam, F. Sun, F. Pacchierotti and J. Parry (2008). "Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy." *Mutat Res* **651**(1-2): 82-92.
- Elliott, J. E., R. J. Norstrom and J. A. Keith (1988). "Organochlorines and eggshell thinning in northern gannets (*Sula bassanus*) from Eastern Canada, 1968-1984." *Environ Pollut* **52**(2): 81-102.
- Eltom, S. E. and W. S. Schwark (1999). "CYP1A1 and CYP1B1, two hydrocarbon-inducible cytochromes P450, are constitutively expressed in neonate and adult goat liver, lung and kidney." *Pharmacol Toxicol* **85**(2): 65-73.
- Erickson, G. F., D. A. Magoffin, C. A. Dyer and C. Hofeditz (1985). "The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships." *Endocr Rev* **6**(3): 371-399.
- Escobar, M. L., O. M. Echeverria, R. Ortiz and G. H. Vazquez-Nin (2008). "Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats." *Apoptosis* **13**(10): 1253-1266.
- Essers, J., A. F. Theil, C. Baldeyron, W. A. van Cappellen, A. B. Houtsmuller, R. Kanaar and W. Vermeulen (2005). "Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9350-9359.
- Evan, G. and T. Littlewood (1998). "A matter of life and cell death." *Science* **281**(5381): 1317-1322.
- Faber, K. A. and C. L. Hughes, Jr. (1991). "The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat." *Biol Reprod* **45**(4): 649-653.
- Fahiminiya, S. and N. Gerard (2010). "[Follicular fluid in mammals]." *Gynecol Obstet Fertil* **38**(6): 402-404.
- Falck, B. (1959). "Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants." *Acta Physiol Scand Suppl* **47**(163): 1-101.
- Falender, A. E., R. Lanz, D. Malenfant, L. Belanger and J. S. Richards (2003). "Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary." *Endocrinology* **144**(8): 3598-3610.
- Familiari, G., A. Caggiati, S. A. Nottola, M. Ermini, M. R. Di Benedetto and P. M. Motta (1993). "Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease." *Hum Reprod* **8**(12): 2080-2087.
- Farini, D., G. La Sala, M. Tedesco and M. De Felici (2007). "Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells." *Dev Biol* **306**(2): 572-583.
- Felicio, L. S., J. F. Nelson and C. E. Finch (1984). "Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification." *Biol Reprod* **31**(3): 446-453.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig and A. Nussenzweig (2004). "H2AX: the histone guardian of the genome." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 959-967.
- Fernandez-Valdivia, R., J. Jeong, A. Mukherjee, S. M. Soyal, J. Li, Y. Ying, F. J. Demayo and J. P. Lydon (2010). "A mouse model to dissect progesterone signaling in the female reproductive tract and mammary gland." *Genesis* **48**(2): 106-113.

- Fillingim, R. B. and T. J. Ness (2000). "Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses." *Neurosci Biobehav Rev* **24**(4): 485-501.
- Finn, C. A. (1962). "Embryonic death in aged mice." *Nature* **194**: 499-500.
- Fischer, L. J. and J. L. Weissinger (1972). "Development in the newborn rat of the conjugation and de-conjugation processes involved in the enterohepatic circulation of diethylstilboestrol." *Xenobiotica* **2**(4): 399-412.
- Fisher, M. B., M. Vandenbranden, K. Findlay, B. Burchell, K. E. Thummel, S. D. Hall and S. A. Wrighton (2000). "Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank." *Pharmacogenetics* **10**(8): 727-739.
- Fishman, R. B., W. S. Branham, R. D. Streck and D. M. Sheehan (1996). "Ontogeny of estrogen receptor messenger ribonucleic acid expression in the postnatal rat uterus." *Biol Reprod* **55**(6): 1221-1230.
- Fitzpatrick, S. L., J. M. Funkhouser, D. M. Sindoni, P. E. Stevis, D. C. Deecher, A. R. Bapat, I. Merchenthaler and D. E. Frail (1999). "Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary." *Endocrinology* **140**(6): 2581-2591.
- Flaws, J. A., J. K. Doerr, I. G. Sipes and P. B. Hoyer (1994). "Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide." *Reprod Toxicol* **8**(6): 509-514.
- Flaws, J. A., A. N. Hirshfield, J. A. Hewitt, J. K. Babus and P. A. Furth (2001). "Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary." *Biol Reprod* **64**(4): 1153-1159.
- Flouriou, G., H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck and F. Gannon (2000). "Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1." *EMBO J* **19**(17): 4688-4700.
- Folsvik, N., J. A. Berge, E. M. Brevik and M. Walday (1999). "Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway." *Chemosphere* **38**(3): 681-691.
- Forabosco, A., C. Sforza, A. De Pol, L. Vizzotto, L. Marzona and V. F. Ferrario (1991). "Morphometric study of the human neonatal ovary." *Anat Rec* **231**(2): 201-208.
- Fortune, J. E., M. Y. Yang and W. Muruvi (2011). "In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle." *Reprod Fertil Dev* **23**(1): 15-22.
- Fowler, P. A., R. A. Anderson, P. T. Saunders, H. Kinnell, J. I. Mason, D. B. Evans, S. Bhattacharya, S. Flannigan, S. Franks, A. Monteiro and P. J. O'Shaughnessy (2011). "Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(6): 1754-1762.
- Franceschini, I. and E. Desroziers (2013). "Development and Aging of the Kisspeptin-GPR54 System in the Mammalian Brain: What are the Impacts on Female Reproductive Function?" *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 22.
- Frick, K. M., Z. Zhao and L. Fan (2011). "The epigenetics of estrogen: epigenetic regulation of hormone-induced memory enhancement." *Epigenetics* **6**(6): 675-680.
- Gagnidze, K., Z. M. Weil, L. C. Faustino, S. M. Schaafsma and D. W. Pfaff (2013). "Early histone modifications in the ventromedial hypothalamus and preoptic area following oestradiol administration." *J Neuroendocrinol* **25**(10): 939-955.
- Garcia-Rudaz, C., F. Luna, V. Tapia, B. Kerr, L. Colgin, F. Galimi, G. A. Dissen, N. D. Rawlings and S. R. Ojeda (2007). "Fxn, a novel gene differentially expressed in the rat ovary at the time of folliculogenesis, is required for normal ovarian histogenesis." *Development* **134**(5): 945-957.
- Garverick, H. A., J. L. Juengel, P. Smith, D. A. Heath, M. N. Burkhart, G. A. Perry, M. F. Smith and K. P. McNatty (2010). "Development of the ovary and ontogeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) alpha and beta during early fetal life in cattle." *Anim Reprod Sci* **117**(1-2): 24-33.

- Gawriluk, T. R., A. N. Hale, J. A. Flaws, C. P. Dillon, D. R. Green and E. B. Rucker, 3rd (2011). "Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary." Reproduction **141**(6): 759-765.
- Gazdar, A. F., H. K. Oie, C. H. Shackleton, T. R. Chen, T. J. Triche, C. E. Myers, G. P. Chrousos, M. F. Brennan, C. A. Stein and R. V. La Rocca (1990). "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis." Cancer Res **50**(17): 5488-5496.
- Gershon, E., A. Hourvitz, S. Reikhav, E. Maman and N. Dekel (2007). "Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice." Faseb J **21**(8): 1893-1901.
- Giacomini, K. M. and S. M. Huang (2013). "Transporters in drug development and clinical pharmacology." Clin Pharmacol Ther **94**(1): 3-9.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski and L. Zhang (2010). "Membrane transporters in drug development." Nat Rev Drug Discov **9**(3): 215-236.
- Giguere, V., N. Yang, P. Segui and R. M. Evans (1988). "Identification of a new class of steroid hormone receptors." Nature **331**(6151): 91-94.
- Gillespie, D. and S. Spiegelman (1965). "A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane." J Mol Biol **12**(3): 829-842.
- Gitlin, D. and M. Boesman (1967). "Sites of serum alpha-fetoprotein synthesis in the human and in the rat." J Clin Invest **46**(6): 1010-1016.
- Glidewell-Kenney, C., L. A. Hurley, L. Pfaff, J. Weiss, J. E. Levine and J. L. Jameson (2007). "Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8173-8177.
- Glydon, R. S. (1957). "The development of the blood supply of the pituitary in the albino rat, with special reference to the portal vessels." J Anat **91**(2): 237-244.
- Goldenberg, R. L., J. L. Vaitukaitis and G. T. Ross (1972). "Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats." Endocrinology **90**(6): 1492-1498.
- Golub, M. S., C. E. Hogrefe, S. L. Germann, B. L. Lasley, K. Natarajan and A. F. Tarantal (2003). "Effects of exogenous estrogenic agents on pubertal growth and reproductive system maturation in female rhesus monkeys." Toxicol Sci **74**(1): 103-113.
- Gondos, B., P. Bhiraleus and C. J. Hobel (1971). "Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries." Am J Obstet Gynecol **110**(5): 644-652.
- Gong, L., N. Aranibar, Y. H. Han, Y. Zhang, L. Lecureux, V. Bhaskaran, P. Khandelwal, C. D. Klaassen and L. D. Lehman-McKeeman (2011). "Characterization of organic anion-transporting polypeptide (Oatp) 1a1 and 1a4 null mice reveals altered transport function and urinary metabolomic profiles." Toxicol Sci **122**(2): 587-597.
- Gonzalez-Martinez, D., C. De Mees, Q. Douhard, C. Szpirer and J. Bakker (2008). "Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges." Endocrinology **149**(5): 2333-2340.
- Gonzalez, M. M., R. Madrid and R. M. Arahuetes (1995). "Physiological changes in antioxidant defences in fetal and neonatal rat liver." Reprod Fertil Dev **7**(5): 1375-1380.
- Gore, A. C., J. L. Roberts and M. J. Gibson (1999). "Mechanisms for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse." Endocrinology **140**(5): 2280-2287.
- Gosland, M., C. Tsuboi, T. Hoffman, S. Goodin and M. Vore (1993). "17 beta-estradiol glucuronide: an inducer of cholestasis and a physiological substrate for the multidrug resistance transporter." Cancer Res **53**(22): 5382-5385.

- Gotoh, Y., Y. Kato, B. Stieger, P. J. Meier and Y. Sugiyama (2002). "Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17beta-D-glucuronide in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(6): E1245-1254.
- Green, D. A., D. R. Brink, M. L. Bauer and T. J. Wester (1992). "Estradiol-17 beta effects on lipid metabolism of adipose tissue in nutritionally induced lean and obese ovariectomized ewes." J Anim Sci **70**(7): 2120-2129.
- Greenfeld, C. R., M. E. Pepling, J. K. Babus, P. A. Furth and J. A. Flaws (2007). "BAX regulates follicular endowment in mice." Reproduction **133**(5): 865-876.
- Greenstein, B. D. (1992). "Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors." Endocrinology **130**(6): 3184-3190.
- Groothuis, P. G., H. H. Dassen, A. Romano and C. Punyadeera (2007). "Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human." Hum Reprod Update **13**(4): 405-417.
- Grzesiak, M., K. Knapczyk-Stwora, M. Duda and M. Slomczynska (2012). "Elevated level of 17beta-estradiol is associated with overexpression of FSHR, CYP19A1, and CTNNB1 genes in porcine ovarian follicles after prenatal and neonatal flutamide exposure." Theriogenology **78**(9): 2050-2060.
- Guengerich, F. P. (1990). "Metabolism of 17 alpha-ethynylestradiol in humans." Life Sci **47**(22): 1981-1988.
- Guigon, C. J., S. Mazaud, M. G. Forest, S. Brailly-Tabard, N. Coudouel and S. Magre (2003a). "Unaltered development of the initial follicular waves and normal pubertal onset in female rats after neonatal deletion of the follicular reserve." Endocrinology **144**(8): 3651-3662.
- Guigon, C. J., S. Mazaud, M. G. Forest, S. Brailly-Tabard and S. Magre (2003b). "Role of the first waves of growing follicles in rat ovarian maturation." Ann Endocrinol (Paris) **64**(2): 85.
- Guillemette, C., A. Belanger and J. Lepine (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." Breast Cancer Res **6**(6): 246-254.
- Guillette, L. J., Jr., T. S. Gross, G. R. Masson, J. M. Matter, H. F. Percival and A. R. Woodward (1994). "Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida." Environ Health Perspect **102**(8): 680-688.
- Guldner, L., L. Multigner, F. Heraud, C. Monfort, J. P. Thome, A. Giusti, P. Kadhel and S. Cordier (2010). "Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone." Environ Res **110**(2): 146-151.
- Gump, J. M. and A. Thorburn (2011). "Autophagy and apoptosis: what is the connection?" Trends Cell Biol **21**(7): 387-392.
- Guo, M., H. Zhang, F. Bian, G. Li, X. Mu, J. Wen, G. Mao, Z. Teng, G. Xia and M. Zhang (2012). "P4 down-regulates Jagged2 and Notch1 expression during primordial folliculogenesis." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 2731-2744.
- Gustafsson, J. A. (1999). "Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action." J Endocrinol **163**(3): 379-383.
- Hahn, K. L., J. Johnson, B. J. Beres, S. Howard and J. Wilson-Rawls (2005). "Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation." Development **132**(4): 817-828.
- Halling, A. and J. G. Forsberg (1990). "Ovarian reproductive function after exposure to diethylstilbestrol in neonatal life." Biol Reprod **43**(3): 472-477.
- Han, X. and J. G. Liehr (1994). "DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy." Carcinogenesis **15**(5): 997-1000.
- Hanker, J. P. (1990). "Gastrointestinal disease and oral contraception." Am J Obstet Gynecol **163**(6 Pt 2): 2204-2207.

- Hartshorne, G. M., S. Lyrakou, H. Hamoda, E. Oloto and F. Ghafari (2009). "Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection?" Mol Hum Reprod **15**(12): 805-819.
- Hatano, O., K. Takayama, T. Imai, M. R. Waterman, A. Takakusu, T. Omura and K. Morohashi (1994). "Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development." Development **120**(10): 2787-2797.
- Hattemer-Frey, H. A. and C. C. Travis (1991). "Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure." Toxicol Ind Health **7**(3): 141-157.
- Heger, S., C. Mastronardi, G. A. Dissen, A. Lomniczi, R. Cabrera, C. L. Roth, H. Jung, F. Galimi, W. Sippell and S. R. Ojeda (2007). "Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis." J Clin Invest **117**(8): 2145-2154.
- Hemann, M. T., K. L. Rudolph, M. A. Strong, R. A. DePinho, L. Chin and C. W. Greider (2001). "Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis." Mol Biol Cell **12**(7): 2023-2030.
- Henderson, S. A. and R. G. Edwards (1968). "Chiasma frequency and maternal age in mammals." Nature **218**(5136): 22-28.
- Herbst, A. L., H. Ulfelder and D. C. Poskanzer (1971). "Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women." N Engl J Med **284**(15): 878-881.
- Herrington, C. S., J. Burns, A. K. Graham, M. Evans and J. O. McGee (1989). "Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes I: relative sensitivity of both reporter molecules for detection of HPV16 in CaSki cells." J Clin Pathol **42**(6): 592-600.
- Hibbert, M. L., R. L. Stouffer, D. P. Wolf and M. B. Zelinski-Wooten (1996). "Midcycle administration of a progesterone synthesis inhibitor prevents ovulation in primates." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1897-1901.
- Hickey, G. J., S. A. Chen, M. J. Besman, J. E. Shively, P. F. Hall, D. Gaddy-Kurten and J. S. Richards (1988). "Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis." Endocrinology **122**(4): 1426-1436.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.
- Hillier, S. G. (1991). "Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries." J Endocrinol **131**(2): 171-175.
- Hirao, J., M. Nishimura, S. Arakawa, N. Niino, K. Mori, T. Furukawa, A. Sanbuissho, S. Manabe, M. Nishihara and Y. Mori (2011). "Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses." J Toxicol Sci **36**(1): 9-22.
- Hirobe, S., W. W. He, M. M. Lee and P. K. Donahoe (1992). "Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity." Endocrinology **131**(2): 854-862.
- Hirshfield, A. N. (1992). "Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats." Biol Reprod **47**(3): 466-472.
- Hiyama, M., E. K. Choi, S. Wakitani, T. Tachibana, H. Khan, K. T. Kusakabe and Y. Kiso (2011). "Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice." J Vet Med Sci **73**(9): 1211-1215.
- Holliday, R. (1994). "Epigenetics: an overview." Dev Genet **15**(6): 453-457.
- Holt, J. E., A. Jackson, S. D. Roman, R. J. Aitken, P. Koopman and E. A. McLaughlin (2006). "CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary follicle transition in the neonatal mouse ovary." Dev Biol **293**(2): 449-460.
- Hong, H., L. Yang and M. R. Stallcup (1999). "Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3." J Biol Chem **274**(32): 22618-22626.

- Hoover, R. N., M. Hyer, R. M. Pfeiffer, E. Adam, B. Bond, A. L. Cheville, T. Colton, P. Hartge, E. E. Hatch, A. L. Herbst, B. Y. Karlan, R. Kaufman, K. L. Noller, J. R. Palmer, S. J. Robboy, R. C. Saal, W. Strohsnitter, L. Titus-Ernstoff and R. Troisi (2011). "Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol." *N Engl J Med* **365**(14): 1304-1314.
- Hopkins, C. R. and H. Gregory (1977). "Topographical localization of the receptors for luteinizing hormone-releasing hormone on the surface of dissociated pituitary cells." *J Cell Biol* **75**(2 Pt 1): 528-540.
- Howdeshell, K. L., P. H. Peterman, B. M. Judy, J. A. Taylor, C. E. Orazio, R. L. Ruhlen, F. S. Vom Saal and W. V. Welshons (2003). "Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature." *Environ Health Perspect* **111**(9): 1180-1187.
- Hunt, P. A. and T. J. Hassold (2002). "Sex matters in meiosis." *Science* **296**(5576): 2181-2183.
- Hunt, P. A., C. Lawson, M. Gieske, B. Murdoch, H. Smith, A. Marre, T. Hassold and C. A. VandeVoort (2012). "Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(43): 17525-17530.
- Hunter, N., G. V. Borner, M. Lichten and N. Kleckner (2001). "Gamma-H2AX illuminates meiosis." *Nat Genet* **27**(3): 236-238.
- Iguchi, T., N. Takasugi, H. A. Bern and K. T. Mills (1986). "Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol." *Teratology* **34**(1): 29-35.
- Iguchi, T., R. Todoroki, N. Takasugi and V. Petrow (1988). "The effects of an aromatase inhibitor and a 5 alpha-reductase inhibitor upon the occurrence of polyovular follicles, persistent anovulation, and permanent vaginal stratification in mice treated neonatally with testosterone." *Biol Reprod* **39**(3): 689-697.
- Ikeda, Y., A. Nagai, M. A. Ikeda and S. Hayashi (2001). "Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary." *Dev Dyn* **221**(4): 443-453.
- Ikeda, Y., A. Nagai, M. A. Ikeda and S. Hayashi (2002). "Increased expression of Mullerian-inhibiting substance correlates with inhibition of follicular growth in the developing ovary of rats treated with E2 benzoate." *Endocrinology* **143**(1): 304-312.
- Inoue, H., G. Yuki, H. Yokota and S. Kato (2003). "Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine." *Drug Metab Dispos* **31**(1): 140-144.
- Insler, V., D. Kleinman and U. Sod-Moriah (1990). "Role of midcycle FSH surge in follicular development." *Gynecol Obstet Invest* **30**(4): 228-233.
- Ishii, M., T. Yamauchi, K. Matsumoto, G. Watanabe, K. Taya and F. Chatani (2012). "Maternal age and reproductive function in female Sprague-Dawley rats." *J Toxicol Sci* **37**(3): 631-638.
- Itaaho, K., P. I. Mackenzie, S. Ikushiro, J. O. Miners and M. Finel (2008). "The configuration of the 17-hydroxy group variably influences the glucuronidation of beta-estradiol and epiestradiol by human UDP-glucuronosyltransferases." *Drug Metab Dispos* **36**(11): 2307-2315.
- Ito, M., K. Yokouchi, K. Yoshida, K. Kano, K. Naito, J. Miyazaki and H. Tojo (2006). "Investigation of the fate of Sry-expressing cells using an in vivo Cre/loxP system." *Dev Growth Differ* **48**(1): 41-47.
- Ivanov, E. L., V. G. Korolev and F. Fabre (1992). "XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination." *Genetics* **132**(3): 651-664.
- Iwai, M., S. Hori, R. Shigemoto, H. Kanzaki, T. Mori and S. Nakanishi (1993). "Localization of endothelin receptor messenger ribonucleic acid in the rat ovary and fallopian tube by in situ hybridization." *Biol Reprod* **49**(4): 675-680.
- Jacobs, M. N., M. Dickins and D. F. Lewis (2003). "Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor beta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure." *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**(2-3): 117-132.
- Jacobsen, P. R., S. Christiansen, J. Boberg, C. Nellemann and U. Hass (2010). "Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats." *Int J Androl* **33**(2): 434-442.

- Jakopovic, M., A. Thomas, S. Balasubramaniam, D. Schrump, G. Giaccone and S. E. Bates (2013). "Targeting the Epigenome in Lung Cancer: Expanding Approaches to Epigenetic Therapy." Front Oncol **3**: 261.
- Jefferson, W., R. Newbold, E. Padilla-Banks and M. Pepling (2006). "Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival." Biol Reprod **74**(1): 161-168.
- Jefferson, W. N., J. F. Couse, E. P. Banks, K. S. Korach and R. R. Newbold (2000). "Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice." Biol Reprod **62**(2): 310-317.
- Jefferson, W. N., J. F. Couse, E. Padilla-Banks, K. S. Korach and R. R. Newbold (2002). "Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions." Biol Reprod **67**(4): 1285-1296.
- Jefferson, W. N., E. Padilla-Banks, E. H. Goulding, S. P. Lao, R. R. Newbold and C. J. Williams (2009). "Neonatal exposure to genistein disrupts ability of female mouse reproductive tract to support preimplantation embryo development and implantation." Biol Reprod **80**(3): 425-431.
- Jefferson, W. N., E. Padilla-Banks and R. R. Newbold (2005). "Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses." Biol Reprod **73**(4): 798-806.
- Jefferson, W. N., E. Padilla-Banks, J. Y. Phelps, K. E. Gerrish and C. J. Williams (2011). "Permanent oviduct posteriorization after neonatal exposure to the phytoestrogen genistein." Environ Health Perspect **119**(11): 1575-1582.
- Jenssen, B. M. (1996). "An overview of exposure to, and effects of, petroleum oil and organochlorine pollution in grey seals (*Halichoerus grypus*)." Sci Total Environ **186**(1-2): 109-118.
- Jeppesen, T. (1977). "The ultrastructure of follicle cells in fetal guinea-pig ovaries." Anat Rec **189**(4): 649-667.
- Johnson, J., J. Canning, T. Kaneko, J. K. Pru and J. L. Tilly (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." Nature **428**(6979): 145-150.
- Johnson, M. D., N. Kenney, A. Stoica, L. Hilakivi-Clarke, B. Singh, G. Chepko, R. Clarke, P. F. Sholler, A. A. Lirio, C. Foss, R. Reiter, B. Trock, S. Paik and M. B. Martin (2003). "Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland." Nat Med **9**(8): 1081-1084.
- Jones, E. C. and P. L. Krohn (1961). "The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice." J Endocrinol **21**: 469-495.
- Jordan, A. and P. Reichard (1998). "Ribonucleotide reductases." Annu Rev Biochem **67**: 71-98.
- Jorgez, C. J., M. Klysik, S. P. Jamin, R. R. Behringer and M. M. Matzuk (2004). "Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects." Mol Endocrinol **18**(4): 953-967.
- Jost, A. (1972). "A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals." Johns Hopkins Med J **130**(1): 38-53.
- Juengel, J. L., H. R. Sawyer, P. R. Smith, L. D. Quirke, D. A. Heath, S. Lun, S. J. Wakefield and K. P. McNatty (2002). "Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries." Mol Cell Endocrinol **191**(1): 1-10.
- Julin, B., A. Wolk, L. Bergkvist, M. Bottai and A. Akesson (2012). "Dietary cadmium exposure and risk of postmenopausal breast cancer: a population-based prospective cohort study." Cancer Res **72**(6): 1459-1466.
- Juneau, C., E. Dupont, V. Luu-The, F. Labrie and G. Pelletier (1993). "Ontogenesis of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 5-delta 4 isomerase in the rat ovary as studied by immunocytochemistry and in situ hybridization." Biol Reprod **48**(2): 226-234.
- Kalfa, N., F. Paris, M. O. Soyer-Gobillard, J. P. Daures and C. Sultan (2011). "Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study." Fertil Steril **95**(8): 2574-2577.

- Kanai, N., R. Lu, Y. Bao, A. W. Wolkoff, M. Vore and V. L. Schuster (1996). "Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter." Am J Physiol **270**(2 Pt 2): F326-331.
- Karavan, J. R. and M. E. Pepling (2012). "Effects of estrogenic compounds on neonatal oocyte development." Reprod Toxicol **34**(1): 51-56.
- Karnaky, K. J. (1951). "Diethylstilbestrol (DES) in treatment of threatened abortion." Ariz Med **8**(1): 36-40.
- Kashimada, K. and P. Koopman (2010). "Sry: the master switch in mammalian sex determination." Development **137**(23): 3921-3930.
- Kato, H., T. Ota, T. Furuhashi, Y. Ohta and T. Iguchi (2003). "Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period." Reprod Toxicol **17**(3): 283-288.
- Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks and H. A. Tilson (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop." Environ Health Perspect **104 Suppl 4**: 715-740.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku and S. Oikawa (2001). "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging." Mutat Res **488**(1): 65-76.
- Kedem-Dickman, A., E. Maman, Y. Yung, G. M. Yerushalmi, R. Hemi, M. Hanochi, J. Dor and A. Hourvitz (2012). "Anti-Mullerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes." Reprod Biomed Online **24**(5): 540-546.
- Keeney, S., C. N. Giroux and N. Kleckner (1997). "Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family." Cell **88**(3): 375-384.
- Kennedy, G. C. (1957). "The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat." J Endocrinol **16**(1): 9-17.
- Kerr, B., C. Garcia-Rudaz, M. Dorfman, A. Paredes and S. R. Ojeda (2009). "NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary." Reproduction **138**(1): 131-140.
- Kerr, J. B., K. J. Hutt, E. M. Michalak, M. Cook, C. J. Vandenberg, S. H. Liew, P. Bouillet, A. Mills, C. L. Scott, J. K. Findlay and A. Strasser (2012). "DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require Tap63-mediated induction of Puma and Noxa." Mol Cell **48**(3): 343-352.
- Kezele, P., E. E. Nilsson and M. K. Skinner (2005a). "Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition." Biol Reprod **73**(5): 967-973.
- Kezele, P. and M. K. Skinner (2003). "Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly." Endocrinology **144**(8): 3329-3337.
- Kezele, P. R., J. M. Ague, E. Nilsson and M. K. Skinner (2005b). "Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development." Biol Reprod **72**(1): 241-255.
- Kidane, D., A. S. Jonason, T. S. Gorton, I. Mihaylov, J. Pan, S. Keeney, D. G. de Rooij, T. Ashley, A. Keh, Y. Liu, U. Banerjee, D. Zelterman and J. B. Sweasy (2010). "DNA polymerase beta is critical for mouse meiotic synapsis." EMBO J **29**(2): 410-423.
- Kidani, T., S. Kamei, J. Miyawaki, J. Aizawa, K. Sakayama and H. Masuno (2010). "Bisphenol A downregulates Akt signaling and inhibits adiponectin production and secretion in 3T3-L1 adipocytes." J Atheroscler Thromb **17**(8): 834-843.
- Kim, H., S. Hayashi, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato (2009). "Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice." Reprod Toxicol **27**(1): 55-62.

- Kimura, F., L. M. Bonomi and A. L. Schneyer (2011). "Follistatin regulates germ cell nest breakdown and primordial follicle formation." *Endocrinology* **152**(2): 697-706.
- Kipp, J. L., S. M. Kilen, S. Bristol-Gould, T. K. Woodruff and K. E. Mayo (2007). "Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary." *Endocrinology* **148**(5): 1968-1976.
- Kirigaya, A., S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato (2006). "Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice." *In Vivo* **20**(6B): 867-873.
- Kissel, H., I. Timokhina, M. P. Hardy, G. Rothschild, Y. Tajima, V. Soares, M. Angeles, S. R. Whitlow, K. Manova and P. Besmer (2000). "Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses." *EMBO J* **19**(6): 1312-1326.
- Klaassen, C. D. and L. M. Aleksunes (2010). "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation." *Pharmacol Rev* **62**(1): 1-96.
- Kliwer, S. A., J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, B. B. Oliver, T. M. Willson, R. H. Zetterstrom, T. Perlmann and J. M. Lehmann (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." *Cell* **92**(1): 73-82.
- Kneitz, B., P. E. Cohen, E. Avdievich, L. Zhu, M. F. Kane, H. Hou, Jr., R. D. Kolodner, R. Kucherlapati, J. W. Pollard and W. Edelmann (2000). "MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice." *Genes Dev* **14**(9): 1085-1097.
- Knight, P. G. and C. Glistler (2001). "Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary." *Reproduction* **121**(4): 503-512.
- Knight, P. G., L. Satchell and C. Glistler (2012). "Intra-ovarian roles of activins and inhibins." *Mol Cell Endocrinol* **359**(1-2): 53-65.
- Kohan-Ghadr, H. R., G. Fecteau, L. C. Smith, B. D. Murphy and R. C. Lefebvre (2011). "Endocrine profiles of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle." *Theriogenology* **76**(5): 911-920.
- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge (1991). "Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry." *Nature* **351**(6322): 117-121.
- Koshimizu, U., M. Watanabe and N. Nakatsuji (1995). "Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro." *Dev Biol* **168**(2): 683-685.
- Koubova, J., D. B. Menke, Q. Zhou, B. Capel, M. D. Griswold and D. C. Page (2006). "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2474-2479.
- Kouki, T., M. Kishitake, M. Okamoto, I. Oosuka, M. Takebe and K. Yamanouchi (2003). "Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis." *Horm Behav* **44**(2): 140-145.
- Krege, J. H., J. B. Hodgin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson and O. Smithies (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15677-15682.
- Kreiner, D., K. Drosch, D. Navot, R. Scott and Z. Rosenwaks (1988). "Spontaneous and pharmacologically induced remissions in patients with premature ovarian failure." *Obstet Gynecol* **72**(6): 926-928.
- Krust, A., S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J. M. Bornert and P. Chambon (1986). "The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors." *EMBO J* **5**(5): 891-897.
- Kubo, K., O. Arai, M. Omura, R. Watanabe, R. Ogata and S. Aou (2003). "Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats." *Neurosci Res* **45**(3): 345-356.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-870.

- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-5930.
- Kumar, A. (1968). "The effects of gonadal hormones on primordial germ cell population in the slender loris." *J. Reprod. Fertil* **16**: 322-323.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk (1997). "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility." *Nat Genet* **15**(2): 201-204.
- Kumar, V., S. Green, A. Staub and P. Chambon (1986). "Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor." *EMBO J* **5**(9): 2231-2236.
- Laan, M., M. Grigorova and I. T. Huhtaniemi (2012). "Pharmacogenetics of follicle-stimulating hormone action." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **19**(3): 220-227.
- Lakhani, N. J., M. A. Sarkar, J. Venitz and W. D. Figg (2003). "2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent." *Pharmacotherapy* **23**(2): 165-172.
- Lala, D. S., D. A. Rice and K. L. Parker (1992). "Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I." *Mol Endocrinol* **6**(8): 1249-1258.
- Lambrot, R., H. Coffigny, C. Pairault, A. C. Donnadieu, R. Frydman, R. Habert and V. Rouiller-Fabre (2006). "Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(7): 2696-2703.
- Landschulz, K. T., R. K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger and H. H. Hobbs (1996). "Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat." *J Clin Invest* **98**(4): 984-995.
- Larsen-Su, S. A. and D. E. Williams (2001). "Transplacental exposure to indole-3-carbinol induces sex-specific expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the liver of Fischer 344 neonatal rats." *Toxicol Sci* **64**(2): 162-168.
- Launay-Vacher, V., H. Izzedine, S. Karie, J. S. Hulot, A. Baumelou and G. Deray (2006). "Renal tubular drug transporters." *Nephron Physiol* **103**(3): p97-106.
- Lawson, C., M. Gieske, B. Murdoch, P. Ye, Y. Li, T. Hassold and P. A. Hunt (2011). "Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A." *Biol Reprod* **84**(1): 79-86.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving and B. L. Hogan (1999). "Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." *Genes Dev* **13**(4): 424-436.
- Lebrun, J. J. and W. W. Vale (1997). "Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1682-1691.
- Lee, J. S., W. O. Ward, J. Liu, H. Ren, B. Vallanat, D. Delker and J. C. Corton (2011). "Hepatic xenobiotic metabolizing enzyme and transporter gene expression through the life stages of the mouse." *PLoS One* **6**(9): e24381.
- Lee, S., D. W. Kang, S. Hudgins-Spivey, A. Krust, E. Y. Lee, Y. Koo, Y. Cheon, M. C. Gye, P. Chambon and C. Ko (2009). "Theca-specific estrogen receptor-alpha knockout mice lose fertility prematurely." *Endocrinology* **150**(8): 3855-3862.
- Lei, L., S. Jin, K. E. Mayo and T. K. Woodruff (2010). "The interactions between the stimulatory effect of follicle-stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis." *Biol Reprod* **82**(1): 13-22.
- Lenie, S., R. Cortvrindt, U. Eichenlaub-Ritter and J. Smitz (2008). "Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities." *Mutat Res* **651**(1-2): 71-81.
- Lepine, J., O. Bernard, M. Plante, B. Tetu, G. Pelletier, F. Labrie, A. Belanger and C. Guillemette (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-

- glucuronosyltransferases expressed in endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(10): 5222-5232.
- Leung, G. S., M. Kawai, J. K. Tai, J. Chen, S. M. Bandiera and T. K. Chang (2009). "Developmental expression and endocrine regulation of CYP1B1 in rat testis." *Drug Metab Dispos* **37**(3): 523-528.
- Levitz, M. and B. K. Young (1977). "Estrogens in pregnancy." *Vitam Horm* **35**: 109-147.
- Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian and W. Vale (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." *Nature* **404**(6776): 411-414.
- Lewis, R. W., N. Brooks, G. M. Milburn, A. Soames, S. Stone, M. Hall and J. Ashby (2003). "The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat." *Toxicol Sci* **71**(1): 74-83.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* **3**(9): 662-673.
- Li, X. F., Y. S. Lin, J. S. Kinsey-Jones and K. T. O'Byrne (2012). "High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats." *Endocrinology* **153**(9): 4422-4431.
- Liehr, J. G. (2000). "Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?" *Endocr Rev* **21**(1): 40-54.
- Lievertz, R. W. (1987). "Pharmacology and pharmacokinetics of estrogens." *Am J Obstet Gynecol* **156**(5): 1289-1293.
- Lin, S. Y., J. R. Morrison, D. J. Phillips and D. M. de Kretser (2003). "Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin." *Reproduction* **126**(2): 133-148.
- Liu, C., W. Duan, R. Li, S. Xu, L. Zhang, C. Chen, M. He, Y. Lu, H. Wu, H. Pi, X. Luo, Y. Zhang, M. Zhong, Z. Yu and Z. Zhou (2013). "Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity." *Cell Death Dis* **4**: e676.
- Liu, D. L., W. Z. Liu, Q. L. Li, H. M. Wang, D. Qian, E. Treuter and C. Zhu (2003). "Expression and functional analysis of liver receptor homologue 1 as a potential steroidogenic factor in rat ovary." *Biol Reprod* **69**(2): 508-517.
- Liu, H., L. L. Luo, Y. S. Qian, Y. C. Fu, X. X. Sui, Y. J. Geng, D. N. Huang, S. T. Gao and R. L. Zhang (2009). "FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries." *Biochem Biophys Res Commun* **381**(4): 722-727.
- Liu, L., E. Mak, R. G. Tirone, E. Tan, P. M. Novikoff, P. Wang, A. W. Wolkoff and K. S. Pang (2005). "Vascular binding, blood flow, transporter, and enzyme interactions on the processing of digoxin in rat liver." *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1): 433-448.
- Liu, R., X. Wang, Q. Liu, S. H. Yang and J. W. Simpkins (2007). "Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of 17beta-estradiol when administered after cerebral ischemia." *Neurosci Lett* **415**(3): 237-241.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Llano, E., Y. Herran, I. Garcia-Tunon, C. Gutierrez-Caballero, E. de Alava, J. L. Barbero, J. Schimenti, D. G. de Rooij, M. Sanchez-Martin and A. M. Pendas (2012). "Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice." *J Cell Biol* **197**(7): 877-885.
- Lobo, R. A. and D. L. Cassidenti (1992). "Pharmacokinetics of oral 17 beta-estradiol." *J Reprod Med* **37**(1): 77-84.
- Lockwood, G. M., S. Muttukrishna, N. P. Groome, D. R. Matthews and W. L. Ledger (1998). "Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(5): 1730-1735.
- Loffler, K. A. and P. Koopman (2002). "Charting the course of ovarian development in vertebrates." *Int J Dev Biol* **46**(4): 503-510.
- Losa, S. M., K. L. Todd, A. W. Sullivan, J. Cao, J. A. Mickens and H. B. Patisaul (2011). "Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling

- pathways and ovarian development in the peripubertal female rat." *Reprod Toxicol* **31**(3): 280-289.
- Lowe, D. A., K. A. Baltgalvis and S. M. Greising (2010). "Mechanisms behind estrogen's beneficial effect on muscle strength in females." *Exerc Sport Sci Rev* **38**(2): 61-67.
- Lowndes, N. F. and G. W. Toh (2005). "DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX." *Curr Biol* **15**(3): R99-R102.
- Lu, R., N. Kanai, Y. Bao, A. W. Wolkoff and V. L. Schuster (1996). "Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone." *Am J Physiol* **270**(2 Pt 2): F332-337.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11162-11166.
- Lucas, A. (1991). "Programming by early nutrition in man." *Ciba Found Symp* **156**: 38-50; discussion 50-55.
- Lucier, G. W., E. M. Lui and C. A. Lamartiniere (1979). "Metabolic activation/deactivation reactions during perinatal development." *Environ Health Perspect* **29**: 7-16.
- Lucifero, D., M. R. Mann, M. S. Bartolomei and J. M. Trasler (2004). "Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting." *Hum Mol Genet* **13**(8): 839-849.
- Lui, J. C., P. Forcinito, M. Chang, W. Chen, K. M. Barnes and J. Baron (2010). "Coordinated postnatal down-regulation of multiple growth-promoting genes: evidence for a genetic program limiting organ growth." *Faseb J* **24**(8): 3083-3092.
- Luoh, S. W., P. A. Bain, R. D. Polakiewicz, M. L. Goodheart, H. Gardner, R. Jaenisch and D. C. Page (1997). "Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice." *Development* **124**(11): 2275-2284.
- Lupardus, P. J., T. Byun, M. C. Yee, M. Hekmat-Nejad and K. A. Cimprich (2002). "A requirement for replication in activation of the ATR-dependent DNA damage checkpoint." *Genes Dev* **16**(18): 2327-2332.
- Luu-The, V., G. Pelletier and F. Labrie (2005). "Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase." *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**(2-5): 269-276.
- Lydall, D., Y. Nikolsky, D. K. Bishop and T. Weinert (1996). "A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes." *Nature* **383**(6603): 840-843.
- MacGregor, J. I. and V. C. Jordan (1998). "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action." *Pharmacol Rev* **50**(2): 151-196.
- Mackenzie, P. I., K. W. Bock, B. Burchell, C. Guillemette, S. Ikushiro, T. Iyanagi, J. O. Miners, I. S. Owens and D. W. Nebert (2005). "Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily." *Pharmacogenet Genomics* **15**(10): 677-685.
- MacLusky, N. J., C. Chaptal and B. S. McEwen (1979). "The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: postnatal development." *Brain Res* **178**(1): 143-160.
- Magoffin, D. A. (2005). "Ovarian theca cell." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(7): 1344-1349.
- Mannervik, B., P. G. Board, J. D. Hayes, I. Listowsky and W. R. Pearson (2005). "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases." *Methods Enzymol* **401**: 1-8.
- Manning, J. E., N. D. Hershey, T. R. Broker, M. Pellegrini, H. K. Mitchell and N. Davidson (1975). "A new method of in situ hybridization." *Chromosoma* **53**(2): 107-117.
- Maresh, G. A., T. M. Timmons and B. S. Dunbar (1990). "Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins." *Biol Reprod* **43**(6): 965-976.
- Marik, J. and J. Hulka (1978). "Luteinized unruptured follicle syndrome: a subtle cause of infertility." *Fertil Steril* **29**(3): 270-274.
- Marshall, J. C., A. C. Dalkin, D. J. Haisenleder, M. L. Griffin and R. P. Kelch (1993). "GnRH pulses--the regulators of human reproduction." *Trans Am Clin Climatol Assoc* **104**: 31-46.
- Martignoni, M., G. M. Groothuis and R. de Kanter (2006). "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**(6): 875-894.

- Martin, B., S. Maudsley, J. McNeilly, L. Nicol, J. Crawford, M. Millar, R. M. Sharpe and A. S. McNeilly (2009). "Neonatal estrogenic effects upon the male rat pituitary: early gonadotrophin attenuation precedes long-term recovery." *Neuromolecular Med* **11**(2): 76-86.
- Martinez de la Escalera, G., A. L. Choi and R. I. Weiner (1992). "Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1852-1855.
- Martins da Silva, S. J., R. A. Bayne, N. Cambray, P. S. Hartley, A. S. McNeilly and R. A. Anderson (2004). "Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation." *Dev Biol* **266**(2): 334-345.
- Marzona, L., R. Arletti, A. Benelli, P. Sena and A. De Pol (2001). "Effects of estrogens and oxytocin on the development of neonatal mammalian ovary." *In Vivo* **15**(4): 271-279.
- Masood, D. E., E. C. Roach, K. G. Beauregard and R. A. Khalil (2010). "Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease." *Curr Drug Metab* **11**(8): 693-714.
- Masse, J., T. Watrin, A. Laurent, S. Deschamps, D. Guerrier and I. Pellerin (2009). "The developing female genital tract: from genetics to epigenetics." *Int J Dev Biol* **53**(2-3): 411-424.
- Matagne, V., C. Mastronardi, R. A. Shapiro, D. M. Dorsa and S. R. Ojeda (2009). "Hypothalamic expression of Eap1 is not directly controlled by ovarian steroids." *Endocrinology* **150**(4): 1870-1878.
- Matagne, V., G. Rasier, M. C. Lebrethon, A. Gerard and J. P. Bourguignon (2004). "Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with perinatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo." *Endocrinology* **145**(6): 2775-2783.
- Matheny, C. J., M. W. Lamb, K. R. Brouwer and G. M. Pollack (2001). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation." *Pharmacotherapy* **21**(7): 778-796.
- Mather, J. P., A. Moore and R. H. Li (1997). "Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators." *Proc Soc Exp Biol Med* **215**(3): 209-222.
- Mathers, J. C., G. Strathdee and C. L. Relton (2010). "Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors." *Adv Genet* **71**: 3-39.
- Matsuda, F., N. Inoue, N. Manabe and S. Ohkura (2012). "Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells." *J Reprod Dev* **58**(1): 44-50.
- Matsumoto, J., H. Yokota and A. Yuasa (2002). "Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy." *Environ Health Perspect* **110**(2): 193-196.
- Matt, D. W., K. D. Dahl, A. Sarkissian and T. E. Sayles (1993). "Apparent absence of negative feedback in middle-aged persistent-estrous rats following luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: relation to plasma inhibin and 17 beta-estradiol." *Biol Reprod* **48**(2): 333-339.
- Matt, D. W., J. Lee, P. L. Sarver, H. L. Judd and J. K. Lu (1986). "Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats." *Biol Reprod* **34**(3): 478-487.
- Matthews, C. H., S. Borgato, P. Beck-Peccoz, M. Adams, Y. Tone, G. Gambino, S. Casagrande, G. Tedeschini, A. Benedetti and V. K. Chatterjee (1993). "Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone." *Nat Genet* **5**(1): 83-86.
- Mayerhofer, A., G. A. Dissen, M. E. Costa and S. R. Ojeda (1997). "A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary." *Endocrinology* **138**(8): 3320-3329.
- Mazaud-Guittot, S., C. N. Nicolaz, C. Desdoits-Lethimonier, I. Coiffec, M. B. Maamar, P. Balaguer, D. M. Kristensen, C. Chevrier, V. Lavoue, P. Poulain, N. Dejucq-Rainsford and B. Jegou (2013).

- "Paracetamol, aspirin and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent." J Clin Endocrinol Metab.
- Mazaud Guittot, S., C. J. Guigon, N. Coudouel and S. Magre (2006). "Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries." Biol Reprod **75**(5): 749-759.
- Mazaud, S., C. J. Guigon, A. Lozach, N. Coudouel, M. G. Forest, H. Coffigny and S. Magre (2002). "Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation." Endocrinology **143**(12): 4775-4787.
- Mazaud, S., R. Guyot, C. J. Guigon, N. Coudouel, B. Le Magueresse-Battistoni and S. Magre (2005). "Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families." Dev Biol **277**(2): 403-416.
- Mazerbourg, S. and A. J. Hsueh (2003). "Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary." Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 31-36.
- Mbadiwe, T. and R. M. Millis (2013). "Epigenetics and Autism." Autism Res Treat **2013**: 826156.
- McCarver, D. G. and R. N. Hines (2002). "The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 361-366.
- McGee, E. A., S. Y. Hsu, A. Kaipia and A. J. Hsueh (1998). "Cell death and survival during ovarian follicle development." Mol Cell Endocrinol **140**(1-2): 15-18.
- McGee, E. A. and A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." Endocr Rev **21**(2): 200-214.
- McGee, E. A., E. Perlas, P. S. LaPolt, A. Tsafiri and A. J. Hsueh (1997). "Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats." Biol Reprod **57**(5): 990-998.
- McKee, A. H. and N. Kleckner (1997). "A general method for identifying recessive diploid-specific mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, its application to the isolation of mutants blocked at intermediate stages of meiotic prophase and characterization of a new gene SAE2." Genetics **146**(3): 797-816.
- McLachlan, J. A., R. R. Newbold, H. C. Shah, M. D. Hogan and R. L. Dixon (1982). "Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES)." Fertil Steril **38**(3): 364-371.
- McLaren, A. (1991). "Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage." Bioessays **13**(4): 151-156.
- Medigovic, I., M. Manojlovic-Stojanoski, S. Trifunovic, N. Ristic, V. Milosevic, D. Zikic and N. Nestorovic (2012). "Effects of genistein on gonadotropic cells in immature female rats." Acta Histochem **114**(3): 270-275.
- Mehlmann, L. M. (2005). "Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation." Reproduction **130**(6): 791-799.
- Meijs-Roelofs, H. M., J. T. Uilenbroek, F. H. de Jong and R. Welschen (1973). "Plasma oestradiol-17beta and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats." J Endocrinol **59**(2): 295-304.
- Merchant-Larios, H. and J. Chimal-Monroy (1989). "The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary." Prog Clin Biol Res **296**: 55-63.
- Mesiano, S. (2009). "The endocrinology of human pregnancy and fetoplacental neuroendocrine development." Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 6th Edition, Physiology, Pathophysiology and Clinical Management, Philadelphia: 249-281.
- Messenger, S., E. E. Chatzidaki, D. Ma, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R. R. Thresher, I. Malinge, D. Lomet, M. B. Carlton, W. H. Colledge, A. Caraty and S. A. Aparicio (2005). "Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1761-1766.
- Meunier, H., S. B. Cajander, V. J. Roberts, C. Rivier, P. E. Sawchenko, A. J. Hsueh and W. Vale (1988). "Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle." Mol Endocrinol **2**(12): 1352-1363.
- Micevych, P. and K. Sinchak (2008). "Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain." Mol Cell Endocrinol **290**(1-2): 44-50.

- Midoro-Horiuti, T., R. Tiwari, C. S. Watson and R. M. Goldblum (2010). "Maternal bisphenol A exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups." Environ Health Perspect **118**(2): 273-277.
- Migliaccio, S., R. R. Newbold, J. A. McLachlan and K. S. Korach (1995). "Alterations in estrogen levels during development affects the skeleton: use of an animal model." Environ Health Perspect **103 Suppl 7**: 95-97.
- Miyagawa, M., K. Maeda, A. Aoyama and Y. Sugiyama (2009). "The eighth and ninth transmembrane domains in organic anion transporting polypeptide 1B1 affect the transport kinetics of estrone-3-sulfate and estradiol-17beta-D-glucuronide." J Pharmacol Exp Ther **329**(2): 551-557.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." Toxicol Lett **170**(1): 19-29.
- Mok-Lin, E., S. Ehrlich, P. L. Williams, J. Petrozza, D. L. Wright, A. M. Calafat, X. Ye and R. Hauser (2010). "Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF." Int J Androl **33**(2): 385-393.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, P. S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M. J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie and R. Lehmann (2003). "The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival." Development **130**(18): 4279-4286.
- Monget, P., J. Bobe, A. Gougeon, S. Fabre, D. Monniaux and R. Dalbès-Tran (2012). "The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective." Mol Cell Endocrinol **356**(1-2): 2-12.
- Monie, I. W. (1963). "Influence of the Environment on the Unborn." Calif Med **99**: 323-327.
- Monje, L., J. Varayoud, E. H. Luque and J. G. Ramos (2007). "Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area." J Endocrinol **194**(1): 201-212.
- Montano, M. M., W. V. Welshons and F. S. vom Saal (1995). "Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats." Biol Reprod **53**(5): 1198-1207.
- Morel, F. and C. Aninat (2011). "The glutathione transferase kappa family." Drug Metab Rev **43**(2): 281-291.
- Morita, Y., T. F. Manganaro, X. J. Tao, S. Martimbeau, P. K. Donahoe and J. L. Tilly (1999). "Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse." Endocrinology **140**(2): 941-949.
- Mork, L., D. M. Maatouk, J. A. McMahon, J. J. Guo, P. Zhang, A. P. McMahon and B. Capel (2012). "Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice." Biol Reprod **86**(2): 37.
- Motta, P. M. and S. Makabe (1982). "Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. A correlated study by scanning and transmission electron microscopy." Cell Tissue Res **226**(3): 493-510.
- Mowa, C. N. and T. Iwanaga (2000). "Developmental changes of the oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of the rat--an analysis by in situ hybridization." J Endocrinol **167**(3): 363-369.
- Mukherjee, B. and S. Burma (2011). "DNA double-strand breaks make bedfellows of ATM and AKT." Cell Cycle **10**(19): 3230.
- Mukherjee, S. B., S. Aravinda, B. Gopalakrishnan, S. Nagpal, D. M. Salunke and C. Shaha (1999). "Secretion of glutathione S-transferase isoforms in the seminiferous tubular fluid, tissue distribution and sex steroid binding by rat GSTM1." Biochem J **340 (Pt 1)**: 309-320.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Munzel, P. A., M. Bruck and K. W. Bock (1994). "Tissue-specific constitutive and inducible expression of rat phenol UDP-glucuronosyltransferase." Biochem Pharmacol **47**(8): 1445-1448.

- Murata, M., A. Tamura, H. Kodama, H. Hirano, O. Takahashi and T. Tanaka (1998). "Possible involvement of very low density lipoproteins in steroidogenesis in the human ovary." Mol Hum Reprod **4**(8): 797-801.
- Murphy, E. (2011). "Estrogen signaling and cardiovascular disease." Circ Res **109**(6): 687-696.
- Muskhelishvili, L., L. D. Freeman, J. R. Latendresse and T. J. Bucci (2002). "An immunohistochemical label to facilitate counting of ovarian follicles." Toxicol Pathol **30**(3): 400-402.
- Myers, M., B. S. Middlebrook, M. M. Matzuk and S. A. Pangas (2009). "Loss of inhibin alpha uncouples oocyte-granulosa cell dynamics and disrupts postnatal folliculogenesis." Dev Biol **334**(2): 458-467.
- Naciff, J. M., M. L. Jump, S. M. Torontali, G. J. Carr, J. P. Tiesman, G. J. Overmann and G. P. Daston (2002). "Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat." Toxicol Sci **68**(1): 184-199.
- Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, C. Ripoll, E. Fuentes, I. Quesada and A. B. Ropero (2011). "Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 251-260.
- Nah, W. H., M. J. Park and M. C. Gye (2011). "Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice." Clin Exp Reprod Med **38**(2): 75-81.
- Nass, T. E., D. W. Matt, H. L. Judd and J. K. Lu (1984). "Prepubertal treatment with estrogen or testosterone precipitates the loss of regular estrous cyclicity and normal gonadotropin secretion in adult female rats." Biol Reprod **31**(4): 723-731.
- Naud, J., J. Michaud, C. Boisvert, K. Desbiens, F. A. Leblond, A. Mitchell, C. Jones, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2007). "Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats." J Pharmacol Exp Ther **320**(3): 978-985.
- Navarro, V. M., R. Fernandez-Fernandez, J. M. Castellano, J. Roa, A. Mayen, M. L. Barreiro, F. Gaytan, E. Aguilar, L. Pinilla, C. Dieguez and M. Tena-Sempere (2004). "Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54." J Physiol **561**(Pt 2): 379-386.
- Navarro, V. M., M. A. Sanchez-Garrido, J. M. Castellano, J. Roa, D. Garcia-Galiano, R. Pineda, E. Aguilar, L. Pinilla and M. Tena-Sempere (2009). "Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation." Endocrinology **150**(5): 2359-2367.
- Ndebele, K., B. Graham and P. B. Tchounwou (2010). "Estrogenic activity of coumestrol, DDT, and TCDD in human cervical cancer cells." Int J Environ Res Public Health **7**(5): 2045-2056.
- Negishi, M., L. G. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, A. Gorokhov, Y. Kakuta and L. C. Pedersen (2001). "Structure and function of sulfotransferases." Arch Biochem Biophys **390**(2): 149-157.
- Nelson, J. F., L. S. Felicio, H. H. Osterburg and C. E. Finch (1981). "Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice." Biol Reprod **24**(4): 784-794.
- Newbold, R. R., B. C. Bullock and J. A. McLachlan (1983). "Exposure to diethylstilbestrol during pregnancy permanently alters the ovary and oviduct." Biol Reprod **28**(3): 735-744.
- Newbold, R. R., R. B. Hanson, W. N. Jefferson, B. C. Bullock, J. Haseman and J. A. McLachlan (1998). "Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol." Carcinogenesis **19**(9): 1655-1663.
- Newbold, R. R., W. N. Jefferson and E. Padilla-Banks (2009). "Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life." Environ Health Perspect **117**(6): 879-885.
- Niedernhofer, L. J. (2008). "Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1180-1189.
- NIH, N. t. r.-. (2008a). "Multigenerational reproductive study of genistein (Cas No. 446-72-0) in Sprague-Dawley rats (feed study)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser(539): 1-266.

- NIH, N. T. R.-. (2008b). "Toxicology and carcinogenesis studies of genistein (Cas No. 446-72-0) in Sprague-Dawley rats (feed study)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser(545): 1-240.
- Nikaido, Y., N. Danbara, M. Tsujita-Kyutoku, T. Yuri, N. Uehara and A. Tsubura (2005). "Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice." In Vivo **19**(3): 487-494.
- Nikaido, Y., K. Yoshizawa, N. Danbara, M. Tsujita-Kyutoku, T. Yuri, N. Uehara and A. Tsubura (2004). "Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring." Reprod Toxicol **18**(6): 803-811.
- Nilsson, B. O., B. Olde and L. M. Leeb-Lundberg (2011a). "G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling." Br J Pharmacol **163**(6): 1131-1139.
- Nilsson, E., G. Dole and M. K. Skinner (2009). "Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition." Reproduction **138**(4): 697-707.
- Nilsson, E. E., R. Schindler, M. I. Savenkova and M. K. Skinner (2011b). "Inhibitory actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly." PLoS One **6**(5): e20087.
- Nilsson, E. E. and M. K. Skinner (2009). "Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries." Mol Cell Endocrinol **313**(1-2): 9-16.
- Nishi, S., H. Matsue, H. Yoshida, R. Yamaoto and M. Sakai (1991). "Localization of the estrogen-binding site of alpha-fetoprotein in the chimeric human-rat proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3102-3105.
- Nishijima, K., S. Tanaka, S. H. Sakamoto, S. Kuwahara, T. Ohno and S. Kitajima (2013). "Populations of follicles in F344/N rats during aging." Reprod Biol **13**(2): 145-149.
- Noteboom, W. D. and J. Gorski (1965). "Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus." Arch Biochem Biophys **111**(3): 559-568.
- Novak, E. M., B. O. Keller and S. M. Innis (2012). "Metabolic development in the liver and the implications of the n-3 fatty acid supply." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(2): G250-259.
- O'Shaughnessy, P. J., D. McLelland and M. W. McBride (1997). "Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary." Biol Reprod **57**(3): 602-608.
- Obata, Y. and T. Kono (2002). "Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth." J Biol Chem **277**(7): 5285-5289.
- Ohta, R., H. Ohmukai, H. Marumo, T. Shindo, T. Nagata and H. Ono (2012). "Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol." Reprod Toxicol **34**(3): 323-330.
- Oinonen, T. and K. O. Lindros (1995). "Hormonal regulation of the zonated expression of cytochrome P-450 3A in rat liver." Biochem J **309** (Pt 1): 55-61.
- Ojeda, S. R., W. W. Andrews, J. P. Advis and S. S. White (1980). "Recent advances in the endocrinology of puberty." Endocr Rev **1**(3): 228-257.
- Okada, A., Y. Ohta, S. L. Brody and T. Iguchi (2004). "Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation." J Endocrinol **182**(2): 219-227.
- Okeke, T., U. Anyaehie and C. Ezenyeaku (2013). "Premature menopause." Ann Med Health Sci Res **3**(1): 90-95.
- Oktay, K., R. S. Schenken and J. F. Nelson (1995). "Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat." Biol Reprod **53**(2): 295-301.
- Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." J Biol Chem **239**: 2370-2378.
- Oriowo, M. A., B. M. Landgren, B. Stenstrom and E. Diczfalusy (1980). "A comparison of the pharmacokinetic properties of three estradiol esters." Contraception **21**(4): 415-424.
- Orisaka, M., K. Tajima, B. K. Tsang and F. Kotsuji (2009). "Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development." J Ovarian Res **2**(1): 9.

- Orth, G., P. Jeanteur and O. Croissant (1971). "Evidence for and localization of vegetative viral DNA replication by autoradiographic detection of RNA-DNA hybrids in sections of tumors induced by Shope papilloma virus." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(8): 1876-1880.
- Ostling, O. and K. J. Johanson (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun **123**(1): 291-298.
- Ostrowski, J. L., P. M. Ingleton, J. C. Underwood and M. A. Parsons (1988). "Increased hepatic androgen receptor expression in female rats during diethylnitrosamine liver carcinogenesis. A possible correlation with liver tumor development." Gastroenterology **94**(5 Pt 1): 1193-1200.
- Otto, C., I. Fuchs, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, P. Andreasen, G. Schwarz, H. Altmann, M. Klewer, M. Schoor, R. Vonk and K. H. Fritzemeier (2009). "GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice." Biol Reprod **80**(1): 34-41.
- Pace, P., J. Taylor, S. Suntharalingam, R. C. Coombes and S. Ali (1997). "Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha." J Biol Chem **272**(41): 25832-25838.
- Padilla-Banks, E., W. N. Jefferson and R. R. Newbold (2006). "Neonatal exposure to the phytoestrogen genistein alters mammary gland growth and developmental programming of hormone receptor levels." Endocrinology **147**(10): 4871-4882.
- Padmanabhan, V. and A. Veiga-Lopez (2011). "Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming." Semin Reprod Med **29**(3): 173-186.
- Padmanabhan, V. and A. Veiga-Lopez (2013). "Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype." Mol Cell Endocrinol **373**(1-2): 8-20.
- Palanisamy, G. S., Y. P. Cheon, J. Kim, A. Kannan, Q. Li, M. Sato, S. R. Mantena, R. L. Sitruk-Ware, M. K. Bagchi and I. C. Bagchi (2006). "A novel pathway involving progesterone receptor, endothelin-2, and endothelin receptor B controls ovulation in mice." Mol Endocrinol **20**(11): 2784-2795.
- Palmer, J. R., E. E. Hatch, R. S. Rao, R. H. Kaufman, A. L. Herbst, K. L. Noller, L. Titus-Ernstoff and R. N. Hoover (2001). "Infertility among women exposed prenatally to diethylstilbestrol." Am J Epidemiol **154**(4): 316-321.
- Pang, Y., J. Dong and P. Thomas (2008). "Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest." Endocrinology **149**(7): 3410-3426.
- Pangas, S. A., Y. Choi, D. J. Ballow, Y. Zhao, H. Westphal, M. M. Matzuk and A. Rajkovic (2006). "Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8090-8095.
- Pape-Zambito, D. A., A. L. Magliaro and R. S. Kensinger (2008). "17Beta-estradiol and estrone concentrations in plasma and milk during bovine pregnancy." J Dairy Sci **91**(1): 127-135.
- Paredes, A., C. Garcia-Rudaz, B. Kerr, V. Tapia, G. A. Dissen, M. E. Costa, A. Cornea and S. R. Ojeda (2005). "Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary." Endocrinology **146**(12): 5267-5277.
- Parl, F. F., K. M. Egan, C. Li and P. S. Croke (2009). "Estrogen exposure, metabolism, and enzyme variants in a model for breast cancer risk prediction." Cancer Inform **7**: 109-121.
- Patel, O. V., M. Hirako, T. Takahashi, N. Sasaki and I. Domeki (1995). "Sex steroid levels throughout gestation in cows carrying normal and malformed fetuses." J Vet Med Sci **57**(4): 659-663.
- Patisaul, H. B., A. E. Fortino and E. K. Polston (2006). "Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV." Neurotoxicol Teratol **28**(1): 111-118.
- Patisaul, H. B., K. L. Todd, J. A. Mickens and H. B. Adewale (2009). "Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats." Neurotoxicology **30**(3): 350-357.

- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol **10**(15): 886-895.
- Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-970.
- Peluso, J. J., R. W. Steger and E. S. Hafez (1976). "Development of gonadotrophin-binding sites in the immature rat ovary." J Reprod Fertil **47**(1): 55-58.
- Pepe, G. J., R. B. Billiar, M. G. Leavitt, N. C. Zachos, J. A. Gustafsson and E. D. Albrecht (2002). "Expression of estrogen receptors alpha and beta in the baboon fetal ovary." Biol Reprod **66**(4): 1054-1060.
- Pepling, M. E. and A. C. Spradling (1998). "Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts." Development **125**(17): 3323-3328.
- Pepling, M. E. and A. C. Spradling (2001). "Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles." Dev Biol **234**(2): 339-351.
- Pepling, M. E., E. A. Sundman, N. L. Patterson, G. W. Gephardt, L. Medico, Jr. and K. I. Wilson (2010). "Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains." Reproduction **139**(2): 349-357.
- Peretz, J., Z. R. Craig and J. A. Flaws (2012). "Bisphenol A inhibits follicle growth and induces atresia in cultured mouse antral follicles independently of the genomic estrogenic pathway." Biol Reprod **87**(3): 63.
- Peretz, J., R. K. Gupta, J. Singh, I. Hernandez-Ochoa and J. A. Flaws (2011). "Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway." Toxicol Sci **119**(1): 209-217.
- Pesce, M., M. G. Farrace, M. Piacentini, S. Dolci and M. De Felici (1993). "Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis)." Development **118**(4): 1089-1094.
- Peters, H., A. G. Byskov, S. Lintern-Moore, M. Faber and M. Andersen (1973). "The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary." J Reprod Fertil **35**(1): 139-141.
- Petit, E., X. Michelet, C. Rauch, J. Bertrand-Michel, F. Terce, R. Legouis and F. Morel (2009). "Glutathione transferases kappa 1 and kappa 2 localize in peroxisomes and mitochondria, respectively, and are involved in lipid metabolism and respiration in *Caenorhabditis elegans*." FEBS J **276**(18): 5030-5040.
- Pigny, P., R. Desailoud, C. Cortet-Rudelli, A. Duhamel, D. Deroubaix-Allard, A. Racadot and D. Dewailly (1997). "Serum alpha-inhibin levels in polycystic ovary syndrome: relationship to the serum androstenedione level." J Clin Endocrinol Metab **82**(6): 1939-1943.
- Pineiro-Carrero, V. M. and E. O. Pineiro (2004). "Liver." Pediatrics **113**(4 Suppl): 1097-1106.
- Pinilla, L., M. L. Barreiro, L. C. Gonzalez, M. Tena-Sempere and E. Aguilar (2002). "Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat." J Endocrinol **172**(3): 441-448.
- Pinilla, L., E. Trimino, P. Garnelo, C. Bellido, R. Aguilar, F. Gaytan and E. Aguilar (1993). "Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats." J Reprod Fertil **97**(1): 13-20.
- Pittman, D. L., J. Cobb, K. J. Schimenti, L. A. Wilson, D. M. Cooper, E. Brignull, M. A. Handel and J. C. Schimenti (1998). "Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog." Mol Cell **1**(5): 697-705.
- Plug, A. W., A. H. Peters, K. S. Keegan, M. F. Hoekstra, P. de Boer and T. Ashley (1998). "Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis." J Cell Sci **111** (Pt 4): 413-423.
- Popat, V. B., V. H. Vanderhoof, K. A. Calis, J. F. Troendle and L. M. Nelson (2008). "Normalization of serum luteinizing hormone levels in women with 46,XX spontaneous primary ovarian insufficiency." Fertil Steril **89**(2): 429-433.

- Prigent, C. and S. Dimitrov (2003). "Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?" J Cell Sci **116**(Pt 18): 3677-3685.
- Puig-Duran, E., B. D. Greenstein and P. C. MacKinnon (1979). "The effects of serum oestrogen-binding components on the unbound oestradiol-17 beta fraction in the serum of developing female rats and on inhibition of [3H]oestradiol uptake by uterine tissue in vitro." J Reprod Fertil **56**(2): 707-714.
- Quandt, L. M. and R. J. Hutz (1993). "Induction by estradiol-17 beta of polycystic ovaries in the guinea pig." Biol Reprod **48**(5): 1088-1094.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, R. M. Harman, C. L. Hu and D. A. Porter (2004). "Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival." J Anim Sci **82 E-Suppl**: E40-52.
- Radovick, S., J. E. Levine and A. Wolfe (2012). "Estrogenic regulation of the GnRH neuron." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 52.
- Raftogianis, R., C. Creveling, R. Weinshilboum and J. Weisz (2000). "Estrogen metabolism by conjugation." J Natl Cancer Inst Monogr(27): 113-124.
- Rajah, R., E. M. Glaser and A. N. Hirshfield (1992). "The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis." Dev Dyn **194**(3): 177-192.
- Rajah, R. and G. S. Sundaram (1994). "Protein distribution and gene expression of collagen type IV in the neonatal rat ovary during follicle formation." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(6): 769-780.
- Rajapakse, N., M. Butterworth and A. Kortenkamp (2005). "Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites." Environ Mol Mutagen **45**(4): 397-404.
- Rajkovic, A., S. A. Pangas, D. Ballow, N. Suzumori and M. M. Matzuk (2004). "NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression." Science **305**(5687): 1157-1159.
- Rajoria, S., R. Suriano, A. George, A. Shanmugam, S. P. Schantz, J. Geliebter and R. K. Tiwari (2011). "Estrogen induced metastatic modulators MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in thyroid cancer." PLoS One **6**(1): e15879.
- Rass, E., A. Grabarz, P. Bertrand and B. S. Lopez (2012). "[Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]." Cancer Radiother **16**(1): 1-10.
- Ratts, V. S., J. A. Flaws, R. Kolp, C. M. Sorenson and J. L. Tilly (1995). "Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad." Endocrinology **136**(8): 3665-3668.
- Raynaud, J. P., C. Mercier-Bodard and E. E. Baulieu (1971). "Rat estradiol binding plasma protein (EBP)." Steroids **18**(6): 767-788.
- Raza, H. (2011). "Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease." FEBS J **278**(22): 4243-4251.
- Redmond, G. P., G. P. Gidwani, M. K. Gupta, N. M. Bedocs, R. Parker, C. Skibinski and W. Bergfeld (1990). "Treatment of androgenic disorders with dexamethasone: dose-response relationship for suppression of dehydroepiandrosterone sulfate." J Am Acad Dermatol **22**(1): 91-93.
- Reinhold, D., A. Goihl, S. Wrenger, A. Reinhold, U. C. Kuhlmann, J. Faust, K. Neubert, A. Thielitz, S. Brocke, M. Tager, S. Ansorge and U. Bank (2009). "Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice." Clin Chem Lab Med **47**(3): 268-274.
- Reynaud, K., S. Halter, Z. Tahir, S. Thoumire, M. Chebrouit and S. Chastant-Maillard (2010). "[Polyovular follicles]." Gynecol Obstet Fertil **38**(6): 395-397.
- Richardson, S. J., V. Senikas and J. F. Nelson (1987). "Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion." J Clin Endocrinol Metab **65**(6): 1231-1237.
- Ricu, M., A. Paredes, M. Greiner, S. R. Ojeda and H. E. Lara (2008). "Functional development of the ovarian noradrenergic innervation." Endocrinology **149**(1): 50-56.

- Riggs, B. L., S. Khosla and L. J. Melton, 3rd (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." *Endocr Rev* **23**(3): 279-302.
- Ritter, J. K. (2000). "Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions." *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 171-193.
- Rivera, O. E., J. Varayoud, H. A. Rodriguez, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2011). "Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb." *Reprod Toxicol* **32**(3): 304-312.
- Rivier, C. and W. Vale (1987). "Inhibin: measurement and role in the immature female rat." *Endocrinology* **120**(4): 1688-1690.
- Roa, J., E. Vigo, J. M. Castellano, F. Gaytan, D. Garcia-Galiano, V. M. Navarro, E. Aguilar, F. A. Dijcks, A. G. Ederveen, L. Pinilla, P. I. van Noort and M. Tena-Sempere (2008). "Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors." *Endocrinology* **149**(11): 5783-5790.
- Rodgers, R. J. and H. F. Irving Rodgers (2002). "Extracellular matrix of the bovine ovarian membrana granulosa." *Mol Cell Endocrinol* **191**(1): 57-64.
- Rodriguez-Casuriaga, R., A. Geisinger, B. Lopez-Carro, V. Porro, R. Wettstein and G. A. Folle (2009). "Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis." *Biol Proced Online* **11**: 184-195.
- Rodriguez, H. A., N. Santambrosio, C. G. Santamaria, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2010). "Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary." *Reprod Toxicol* **30**(4): 550-557.
- Roeder, G. S. (1997). "Meiotic chromosomes: it takes two to tango." *Genes Dev* **11**(20): 2600-2621.
- Roeder, G. S. and J. M. Bailis (2000). "The pachytene checkpoint." *Trends Genet* **16**(9): 395-403.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Rogan, E. G., A. F. Badawi, P. D. Devanesan, J. L. Meza, J. A. Edney, W. W. West, S. M. Higginbotham and E. L. Cavalieri (2003). "Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer." *Carcinogenesis* **24**(4): 697-702.
- Roman-Blas, J. A., S. Castaneda, R. Largo and G. Herrero-Beaumont (2009). "Osteoarthritis associated with estrogen deficiency." *Arthritis Res Ther* **11**(5): 241.
- Roos, R., P. L. Andersson, K. Halldin, H. Hakansson, E. Westerholm, T. Hamers, G. Hamscher, P. Heikkinen, M. Korkalainen, H. A. Leslie, M. Niittynen, S. Sankari, H. J. Schmitz, L. T. van der Ven, M. Viluksela and D. Schrenk (2011). "Hepatic effects of a highly purified 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in male and female rats." *Toxicology* **284**(1-3): 42-53.
- Rouiller-Fabre, V., R. Lambrot, V. Muczynski, H. Coffigny, C. Lecureuil, C. Pairault, M. Bakalska, A. M. Courtot, R. Frydman and R. Habert (2008). "[Development and regulations of testicular functions in the human foetus]." *Gynecol Obstet Fertil* **36**(9): 898-907.
- Roy, J. R., S. Chakraborty and T. R. Chakraborty (2009). "Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review." *Med Sci Monit* **15**(6): RA137-145.
- Roy, S. K. and L. Albee (2000). "Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster." *Endocrinology* **141**(12): 4449-4456.
- Roy, S. K. and J. Hughes (1994). "Ontogeny of granulosa cells in the ovary: lineage-specific expression of transforming growth factor beta 2 and transforming growth factor beta 1." *Biol Reprod* **51**(5): 821-830.
- Rubin, B. S. and A. M. Soto (2009). "Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight." *Mol Cell Endocrinol* **304**(1-2): 55-62.
- Ruiz, M. L., S. S. Villanueva, M. G. Luquita, M. Vore, A. D. Mottino and V. A. Catania (2006). "Ethinylestradiol increases expression and activity of rat liver MRP3." *Drug Metab Dispos* **34**(6): 1030-1034.

- Runge-Morris, M. A. (1997). "Regulation of expression of the rodent cytosolic sulfotransferases." *Faseb J* **11**(2): 109-117.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Samartzis, N., E. P. Samartzis, A. Noske, A. Fedier, K. J. Dedes, R. Caduff, D. Fink and P. Imesch (2012). "Expression of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in endometriosis: a tissue microarray study." *Reprod Biol Endocrinol* **10**: 30.
- Samuel, D. E. (1967). a review of the effects of plant estrogenic substances on animal reproduction. *the ohio journal of science* **67**: 308-312.
- Sanchez, F. and J. Smitz (2012). "Molecular control of oogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1822**(12): 1896-1912.
- Sar, M. and F. Welsch (1999). "Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary." *Endocrinology* **140**(2): 963-971.
- Sarraj, M. A. and A. E. Drummond (2012). "Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease." *Reproduction* **143**(2): 151-163.
- Sattler, B., K. S. Randall and D. Choiniere (2012). "Reducing hazardous chemical exposures in the neonatal intensive care unit: a new role for nurses." *Crit Care Nurs Q* **35**(1): 102-112.
- Saunders, P. T., R. M. Sharpe, K. Williams, S. Macpherson, H. Urquart, D. S. Irvine and M. R. Millar (2001). "Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates." *Mol Hum Reprod* **7**(3): 227-236.
- Sawyer, H. R., P. Smith, D. A. Heath, J. L. Juengel, S. J. Wakefield and K. P. McNatty (2002). "Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep." *Biol Reprod* **66**(4): 1134-1150.
- Schatten, H., G. Schatten, D. Mazia, R. Balczon and C. Simerly (1986). "Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(1): 105-109.
- Schaub, M. C. (1964). "Changes of Collagen in the Aging and in the Pregnant Uterus of White Rats." *Gerontologia* **10**: 137-145.
- Schendzielorz, N., A. Rysa, I. Reenila, A. Raasmaja and P. T. Mannisto (2011). "Complex estrogenic regulation of catechol-O-methyltransferase (COMT) in rats." *J Physiol Pharmacol* **62**(4): 483-490.
- Schindler, R., E. Nilsson and M. K. Skinner (2010). "Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF." *PLoS One* **5**(9): e12979.
- Schlumpf, M., B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann and W. Lichtensteiger (2001). "In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens." *Environ Health Perspect* **109**(3): 239-244.
- Schmahl, J. and B. Capel (2003). "Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad." *Dev Biol* **258**(2): 264-276.
- Schomberg, D. W., J. F. Couse, A. Mukherjee, D. B. Lubahn, M. Sar, K. E. Mayo and K. S. Korach (1999). "Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult." *Endocrinology* **140**(6): 2733-2744.
- Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow and T. Ragg (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC Mol Biol* **7**: 3.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin and W. M. Bonner (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." *Radiat Res* **158**(4): 486-492.
- Seminara, S. B., S. Messenger, E. E. Chatzidaki, R. R. Thresher, J. S. Acierno, Jr., J. K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K. M. Schwinof, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, U. B. Kaiser, S. A. Slaugenhaupt, J. F. Gusella, S. O'Rahilly, M. B. Carlton, W. F. Crowley, Jr., S. A. Aparicio and

- W. H. Colledge (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty." N Engl J Med **349**(17): 1614-1627.
- Sfakianos, J., L. Coward, M. Kirk and S. Barnes (1997). "Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats." J Nutr **127**(7): 1260-1268.
- Shaikh, A. A. (1971). "Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy." Biol Reprod **5**(3): 297-307.
- Sharpe, R. M. and N. E. Skakkebaek (1993). "Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?" Lancet **341**(8857): 1392-1395.
- Sharples, G. J. and D. R. Leach (1995). "Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of Escherichia coli and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of yeast." Mol Microbiol **17**(6): 1215-1217.
- Shatalova, E. G., S. E. Walther, O. O. Favorova, T. R. Rebbeck and R. L. Blanchard (2005). "Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study." Breast Cancer Res **7**(6): R909-921.
- Shimada, T., H. Yamazaki, M. Mimura, N. Wakamiya, Y. F. Ueng, F. P. Guengerich and Y. Inui (1996). "Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs." Drug Metab Dispos **24**(5): 515-522.
- Shin, S. Y., J. R. Lee, G. W. Noh, H. J. Kim, W. J. Kang, S. H. Kim and J. K. Chung (2008). "Analysis of serum levels of anti-Mullerian hormone, inhibin B, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and follicle-stimulating hormone with respect to age and menopausal status." J Korean Med Sci **23**(1): 104-110.
- Shiorta, M., J. Kawashima, T. Nakamura, Y. Ogawa, J. Kamiie, K. Yasuno, K. Shirota and M. Yoshida (2012). "Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17alpha-ethynylestradiol on reproductive function in female rats." J Toxicol Sci **37**(4): 681-690.
- Shiratani, H., M. Katoh, M. Nakajima and T. Yokoi (2008). "Species differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in mice and rats." Drug Metab Dispos **36**(9): 1745-1752.
- Shiroishi, T., T. Sagai, N. Hanzawa, H. Gotoh and K. Moriwaki (1991). "Genetic control of sex-dependent meiotic recombination in the major histocompatibility complex of the mouse." EMBO J **10**(3): 681-686.
- Shupnik, M. A. (1996). "Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone." Biol Reprod **54**(2): 279-286.
- Silva, E., N. Rajapakse and A. Kortenkamp (2002). "Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects." Environ Sci Technol **36**(8): 1751-1756.
- Silverman, A. J., J. Jhamandas and L. P. Renaud (1987). "Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence." J Neurosci **7**(8): 2312-2319.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res **175**(1): 184-191.
- Sisk, C. L., H. N. Richardson, P. E. Chappell and J. E. Levine (2001). "In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus." Endocrinology **142**(7): 2929-2936.
- Sivils, J. C., I. Gonzalez and L. J. Bain (2010). "Mice lacking Mrp1 have reduced testicular steroid hormone levels and alterations in steroid biosynthetic enzymes." Gen Comp Endocrinol **167**(1): 51-59.
- Skyner, M. J., J. A. Sim and A. E. Herbison (1999). "Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **140**(11): 5195-5201.
- Slot, K. A., J. Kastelijn, A. Bachelot, P. A. Kelly, N. Binart and K. J. Teerds (2006). "Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice." Reproduction **131**(3): 525-532.

- Smith, C. C., M. R. O'Donovan and E. A. Martin (2006). "hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOLIII." Mutagenesis **21**(3): 185-190.
- Sobell, H. M. (1975). "A mechanism to activate branch migration between homologous DNA molecules in genetic recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(1): 279-283.
- Soto, A. M. and C. Sonnenschein (1980). "Control of growth of estrogen-sensitive cells: role for alpha-fetoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 2084-2087.
- Sotomayor-Zarate, R., M. Dorfman, A. Paredes and H. E. Lara (2008). "Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat." Biol Reprod **78**(4): 673-680.
- Sotomayor-Zarate, R., M. Tiszavari, G. Cruz and H. E. Lara (2011). "Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat." Fertil Steril **96**(6): 1490-1496.
- Soules, M. R., S. Sherman, E. Parrott, R. Rebar, N. Santoro, W. Utian and N. Woods (2001). "Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW)." Fertil Steril **76**(5): 874-878.
- Soyal, S. M., A. Amleh and J. Dean (2000). "FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation." Development **127**(21): 4645-4654.
- Spears, N., M. D. Molinek, L. L. Robinson, N. Fulton, H. Cameron, K. Shimoda, E. E. Telfer, R. A. Anderson and D. J. Price (2003). "The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human." Development **130**(22): 5481-5491.
- Speed, R. M. (1988). "The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes." Hum Genet **78**(3): 260-266.
- Stahelin, H. B. (1999). "[Estrogens and Alzheimer disease]." Schweiz Med Wochenschr **129**(49): 1920-1925.
- Stein, M. L. L. I. F. (1935). "Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries." Am J Obstet Gynecol **29**: 181-191.
- Stocco, C., C. Telleria and G. Gibori (2007). "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression." Endocr Rev **28**(1): 117-149.
- Stoker, T. E., J. M. Goldman and R. L. Cooper (2001). "Delayed ovulation and pregnancy outcome: effect of environmental toxicants on the neuroendocrine control of the ovary(1)." Environ Toxicol Pharmacol **9**(3): 117-129.
- Strassburg, C. P., A. Strassburg, S. Kneip, A. Barut, R. H. Tukey, B. Rodeck and M. P. Manns (2002). "Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults." Gut **50**(2): 259-265.
- Stroheker, T., N. Cabaton, G. Nourdin, J. F. Regnier, J. C. Lhuguenot and M. C. Chagnon (2005). "Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate." Toxicology **208**(1): 115-121.
- Sui, X. X., L. L. Luo, J. J. Xu and Y. C. Fu (2010). "Evidence that FOXO3a is involved in oocyte apoptosis in the neonatal rat ovary." Biochem Cell Biol **88**(4): 621-628.
- Sun, H., L. Liu and K. S. Pang (2006). "Increased estrogen sulfation of estradiol 17beta-D-glucuronide in metastatic tumor rat livers." J Pharmacol Exp Ther **319**(2): 818-831.
- Sun, H., Y. Y. Zeng and K. S. Pang (2010). "Interplay of phase II enzymes and transporters in futile cycling: influence of multidrug resistance-associated protein 2-mediated excretion of estradiol 17beta-D-glucuronide and its 3-sulfate metabolite on net sulfation in perfused TR(-) and Wistar rat liver preparations." Drug Metab Dispos **38**(5): 769-780.
- Surani, M. A., S. C. Barton and M. L. Norris (1984). "Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis." Nature **308**(5959): 548-550.
- Susiarjo, M., T. J. Hassold, E. Freeman and P. A. Hunt (2007). "Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse." PLoS Genet **3**(1): e5.
- Susiarjo, M., I. Sasson, C. Mesaros and M. S. Bartolomei (2013). "Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse." PLoS Genet **9**(4): e1003401.

- Swain, A. and R. Lovell-Badge (1999). "Mammalian sex determination: a molecular drama." Genes Dev **13**(7): 755-767.
- Swartz, S. K. and M. S. Soloff (1974). "The lack of estrogen binding by human alpha-fetoprotein." J Clin Endocrinol Metab **39**(3): 589-591.
- Symonds, D. A., K. P. Miller, D. Tomic and J. A. Flaws (2006). "Effect of methoxychlor and estradiol on cytochrome p450 enzymes in the mouse ovarian surface epithelium." Toxicol Sci **89**(2): 510-514.
- Szabo, P. E. and J. R. Mann (1995). "Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting." Genes Dev **9**(15): 1857-1868.
- Tabb, M. M. and B. Blumberg (2006). "New modes of action for endocrine-disrupting chemicals." Mol Endocrinol **20**(3): 475-482.
- Tamai, I. (2012). "Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters." Adv Drug Deliv Rev **64**(6): 508-514.
- Tanaka, H., L. A. Pereira, M. Nozaki, J. Tsuchida, K. Sawada, H. Mori and Y. Nishimune (1997). "A germ cell-specific nuclear antigen recognized by a monoclonal antibody raised against mouse testicular germ cells." Int J Androl **20**(6): 361-366.
- Taneda, S., Y. Mori, K. Kamata, H. Hayashi, C. Furuta, C. Li, K. Seki, A. Sakushima, S. Yoshino, K. Yamaki, G. Watanabe, K. Taya and A. K. Suzuki (2004). "Estrogenic and anti-androgenic activity of nitrophenols in diesel exhaust particles (DEP)." Biol Pharm Bull **27**(6): 835-837.
- Tateishi, N., T. Higashi, K. Nakashima and Y. Sakamoto (1980). "Nutritional significance of increase in gamma-glutamyltransferase in mouse liver before birth." J Nutr **110**(3): 409-415.
- Taylor, J. A., W. V. Welshons and F. S. Vom Saal (2008). "No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice." Reprod Toxicol **25**(2): 169-176.
- Taylor, J. M., R. Illmensee and J. Summers (1976). "Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase." Biochim Biophys Acta **442**(3): 324-330.
- Tellgren, A., T. J. Wood, A. Flores-Morales, U. B. Torndal, L. Eriksson and G. Norstedt (2003). "Differentially expressed transcripts in neoplastic hepatic nodules and neonatal rat liver studied by cDNA microarray analysis." Int J Cancer **104**(2): 131-138.
- Tenhunen, J. and I. Ulmanen (1993). "Production of rat soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase forms from bifunctional mRNAs." Biochem J **296** (Pt 3): 595-600.
- Thelander, L. and P. Berg (1986). "Isolation and characterization of expressible cDNA clones encoding the M1 and M2 subunits of mouse ribonucleotide reductase." Mol Cell Biol **6**(10): 3433-3442.
- Titus-Ernstoff, L., R. Troisi, E. E. Hatch, L. A. Wise, J. Palmer, M. Hyer, R. Kaufman, E. Adam, W. Strohsnitter, K. Noller, A. L. Herbst, J. Gibson-Chambers, P. Hartge and R. N. Hoover (2006). "Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES)." Int J Epidemiol **35**(4): 862-868.
- Tiwary, C. M. (1998). "Premature sexual development in children following the use of estrogen- or placenta-containing hair products." Clin Pediatr (Phila) **37**(12): 733-739.
- Toft, D. and J. Gorski (1966). "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization." Proc Natl Acad Sci U S A **55**(6): 1574-1581.
- Tomaszewski, J., A. Joseph, D. Archambeault and H. H. Yao (2007). "Essential roles of inhibin beta A in mouse epididymal coiling." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11322-11327.
- Tong, J. H. and A. D'Iorio (1977). "Solubilization and partial purification of particulate catechol-O-methyltransferase from rat liver." Can J Biochem **55**(10): 1108-1113.
- Trauner, M., M. Arrese, C. J. Soroka, M. Ananthanarayanan, T. A. Koepfel, S. F. Schlosser, F. J. Suchy, D. Keppler and J. L. Boyer (1997). "The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis." Gastroenterology **113**(1): 255-264.
- Treloar, A. E., R. E. Boynton, B. G. Behn and B. W. Brown (1967). "Variation of the human menstrual cycle through reproductive life." Int J Fertil **12**(1 Pt 2): 77-126.

- Trombly, D. J., T. K. Woodruff and K. E. Mayo (2009). "Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation." Endocrinology **150**(2): 1014-1024.
- Tsafiriri, A. and R. Reich (1999). "Molecular aspects of mammalian ovulation." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(1): 1-11.
- Turker, M. S. (2000). "Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer?" Mech Ageing Dev **117**(1-3): 1-19.
- Turner, K. J. and R. M. Sharpe (1997). "Environmental oestrogens--present understanding." Rev Reprod **2**(2): 69-73.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.
- Ubaldi, F., L. Rienzi, E. Baroni, S. Ferrero, M. Iacobelli, M. G. Minasi, F. Sapienza, F. Martinez, L. Cobellis and E. Greco (2003). "Implantation in patients over 40 and raising FSH levels--a review." Placenta **24 Suppl B**: S34-38.
- Udomsuk, L., K. Jarukamjorn, W. Putalun, T. Sakuma, Y. Kawasaki and N. Nemoto (2011). "Modified expression of aryl hydrocarbon receptor-related genes by deoxymiroestrol, a phytoestrogen, in mouse hepatocytes in primary culture." J Ethnopharmacol **137**(1): 902-908.
- Uhlenhaut, N. H. and M. Treier (2006). "Foxl2 function in ovarian development." Mol Genet Metab **88**(3): 225-234.
- Uriel, J., B. de Nechaud and M. Dupiers (1972). "Estrogen-binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. Demonstration by immuno-autoradiographic methods." Biochem Biophys Res Commun **46**(3): 1175-1180.
- Uzumcu, M., A. M. Zama and E. Oruc (2012). "Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: gonadal effects and role in female reproduction." Reprod Domest Anim **47 Suppl 4**: 338-347.
- Vakharia, D. and G. J. Mizejewski (2000). "Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer." Breast Cancer Res Treat **63**(1): 41-52.
- Van Cappellen, W. A., H. M. Meijs-Roelofs, P. Kramer and H. M. Van den Dungen (1989). "Ovarian follicle dynamics in immature rats treated with a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist (Org. 30276)." Biol Reprod **40**(6): 1247-1256.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, C. M. Schaeberle, A. A. Ucci, C. Sonnenschein, B. S. Rubin and A. M. Soto (2008). "Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice." Reprod Toxicol **26**(3-4): 210-219.
- Vanderhyden, B. C. (1993). "Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s)." J Reprod Fertil **98**(1): 219-227.
- Varayoud, J., J. G. Ramos, V. L. Bosquiaz, M. Lower, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2011). "Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites." Endocrinology **152**(3): 1101-1111.
- Veerappan, C. S., S. Sleiman and G. Coppola (2013). "Epigenetics of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Neurotherapeutics **10**(4): 709-721.
- Velders, M., B. Schleipen, K. H. Fritzemeier, O. Zierau and P. Diel (2012). "Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration." FASEB J **26**(5): 1909-1920.
- Versee, V. and A. O. Barel (1978). "Rat alpha-foetoprotein. Purification, physicochemical characterization, oestrogen-binding properties and chemical modification of the thiol group." Biochem J **175**(1): 73-81.
- Vicencio, J. M., L. Galluzzi, N. Tajeddine, C. Ortiz, A. Criollo, E. Tasdemir, E. Morselli, A. Ben Younes, M. C. Maiuri, S. Lavandro and G. Kroemer (2008). "Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review." Gerontology **54**(2): 92-99.
- Viger, R. S., D. W. Silversides and J. J. Tremblay (2005). "New insights into the regulation of mammalian sex determination and male sex differentiation." Vitam Horm **70**: 387-413.
- Visser JA, S. I., Laven JS, Themmen AP. (2012). "Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency." Nat Rev Endocrinol. **8**(6): 331-341.

- Visser, J. A. and A. P. Themmen (2005). "Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis." Mol Cell Endocrinol **234**(1-2): 81-86.
- Vivacqua, A., D. Bonofiglio, L. Albanito, A. Madeo, V. Rago, A. Carpino, A. M. Musti, D. Picard, S. Ando and M. Maggiolini (2006). "17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30." Mol Pharmacol **70**(4): 1414-1423.
- Wada, K., N. Yokotani, C. Hunter, K. Doi, R. J. Wenthold and S. Shimasaki (1992). "Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 197-201.
- Walters, K. A., C. M. Allan and D. J. Handelsman (2012). "Rodent models for human polycystic ovary syndrome." Biol Reprod **86**(5): 149, 141-112.
- Wang, C., B. Dehghani, I. J. Magrisso, E. A. Rick, E. Bonhomme, D. B. Cody, L. A. Elenich, S. Subramanian, S. J. Murphy, M. J. Kelly, J. S. Rosenbaum, A. A. Vandenberg and H. Offner (2008a). "GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy." Mol Endocrinol **22**(3): 636-648.
- Wang, C., E. R. Prossnitz and S. K. Roy (2008b). "G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary." Endocrinology **149**(9): 4452-4461.
- Wang, C. and S. K. Roy (2007). "Development of primordial follicles in the hamster: role of estradiol-17beta." Endocrinology **148**(4): 1707-1716.
- Wang, C. and S. K. Roy (2010). "Expression of E-cadherin and N-cadherin in perinatal hamster ovary: possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone." Endocrinology **151**(5): 2319-2330.
- Wang, C. F. and S. S. Yen (1975). "Direct evidence of estrogen modulation of pituitary sensitivity to luteinizing hormone-releasing factor during the menstrual cycle." J Clin Invest **55**(1): 201-204.
- Wang, J. and S. K. Roy (2004). "Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone." Biol Reprod **70**(3): 577-585.
- Wang, N., P. Zhang, X. Guo, Z. Zhou and J. Sha (2011). "Hnrnpk, a protein differentially expressed in immature rat ovarian development, is required for normal primordial follicle assembly and development." Endocrinology **152**(3): 1024-1035.
- Weakley, B. S. (1967). "Light and electron microscopy of developing germ cells and follicle cells in the ovary of the golden hamster: twenty-four hours before birth to eight days post partum." J Anat **101**(Pt 3): 435-459.
- Weenen, C., J. S. Laven, A. R. Von Bergh, M. Cranfield, N. P. Groome, J. A. Visser, P. Kramer, B. C. Fauser and A. P. Themmen (2004). "Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment." Mol Hum Reprod **10**(2): 77-83.
- Weichman, B. M. and A. C. Notides (1980). "Estrogen receptor activation and the dissociation kinetics of estradiol, estriol, and estrone." Endocrinology **106**(2): 434-439.
- Welt, C. K., Y. L. Pagan, P. C. Smith, K. B. Rado and J. E. Hall (2003). "Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition." J Clin Endocrinol Metab **88**(4): 1766-1771.
- Wen, J., H. Zhang, G. Li, G. Mao, X. Chen, J. Wang, M. Guo, X. Mu, H. Ouyang, M. Zhang and G. Xia (2009). "PAR6, a potential marker for the germ cells selected to form primordial follicles in mouse ovary." PLoS One **4**(10): e7372.
- Wen, S., G. Cao, T. Bao, L. Cheng, H. Li, C. Du, Y. Tu, Q. Li, R. Jian, P. Zhao and Wuriliga (2012). "Modulation of ovine SBD-1 expression by 17beta-estradiol in ovine oviduct epithelial cells." BMC Vet Res **8**: 143.
- Wheeler, K. T. and G. B. Nelson (1987). "Saturation of a DNA repair process in dividing and nondividing mammalian cells." Radiat Res **109**(1): 109-117.

- Wilcox, A. J., D. M. Umbach, P. P. Hornsby and A. L. Herbst (1995). "Age at menarche among diethylstilbestrol granddaughters." *Am J Obstet Gynecol* **173**(3 Pt 1): 835-836.
- Williams, B. A., K. T. Mills, C. D. Burroughs and H. A. Bern (1989). "Reproductive alterations in female C57BL/Crgl mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenic mycotoxin." *Cancer Lett* **46**(3): 225-230.
- Williams, K. C., N. E. Renthal, R. D. Gerard and C. R. Mendelson (2012). "The microRNA (miR)-199a/214 cluster mediates opposing effects of progesterone and estrogen on uterine contractility during pregnancy and labor." *Mol Endocrinol* **26**(11): 1857-1867.
- Williams, S. A. and P. Stanley (2011). "Premature ovarian failure in mice with oocytes lacking core 1-derived O-glycans and complex N-glycans." *Endocrinology* **152**(3): 1057-1066.
- Williamson, L. M. and S. P. Lees-Miller (2011). "Estrogen receptor alpha-mediated transcription induces cell cycle-dependent DNA double-strand breaks." *Carcinogenesis* **32**(3): 279-285.
- Wilson, A. M. and G. A. Reed (2001). "Predominant 4-hydroxylation of estradiol by constitutive cytochrome P450s in the female ACI rat liver." *Carcinogenesis* **22**(2): 257-263.
- Wilson, M. E. and R. J. Handa (1998). "Activin subunit, follistatin, and activin receptor gene expression in the prepubertal female rat pituitary." *Biol Reprod* **59**(2): 278-283.
- Wise, P. M. (1999). "Neuroendocrine modulation of the "menopause": insights into the aging brain." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 1): E965-970.
- Woessner, J. F., Jr. (1963). "Age-Related Changes of the Human Uterus and Its Connective Tissue Framework." *J Gerontol* **18**: 220-226.
- Woller, M. J., G. Everson-Binotto, E. Nichols, A. Acheson, K. L. Keen, C. Y. Bowers and E. Terasawa (2002). "Aging-related changes in release of growth hormone and luteinizing hormone in female rhesus monkeys." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(11): 5160-5167.
- Wu, C. H., T. Motohashi, H. A. Abdel-Rahman, G. L. Flickinger and G. Mikhail (1976). "Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* **43**(2): 436-445.
- Wu, J., P. L. Nayudu, P. S. Kiesel and H. W. Michelmann (2000). "Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro." *Biol Reprod* **63**(1): 320-327.
- Xi, W., C. K. Lee, W. S. Yeung, J. P. Giesy, M. H. Wong, X. Zhang, M. Hecker and C. K. Wong (2011). "Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice." *Reprod Toxicol* **31**(4): 409-417.
- Xu, B., J. Hua, Y. Zhang, X. Jiang, H. Zhang, T. Ma, W. Zheng, R. Sun, W. Shen, J. Sha, H. J. Cooke and Q. Shi (2011). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries." *PLoS One* **6**(1): e16046.
- Xu, J. and T. Gridley (2013). "Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles." *BMC Biol* **11**: 13.
- Xu, J., Y. Osuga, T. Yano, Y. Morita, X. Tang, T. Fujiwara, Y. Takai, H. Matsumi, K. Koga, Y. Taketani and O. Tsutsumi (2002). "Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2): 456-462.
- Yager, J. D. and J. G. Liehr (1996). "Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 203-232.
- Yamada, H., I. Furuta, E. H. Kato, S. Kataoka, Y. Usuki, G. Kobashi, F. Sata, R. Kishi and S. Fujimoto (2002). "Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester." *Reprod Toxicol* **16**(6): 735-739.
- Yamamoto, M., M. Shirai, K. Sugita, N. Nagai, Y. Miura, R. Mogi, K. Yamamoto, A. Tamura and K. Arishima (2003). "Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring." *J Toxicol Sci* **28**(5): 385-394.
- Yamamoto, T., T. Fukushima, R. Kikkawa, H. Yamada and I. Horii (2005). "Protein expression analysis of rat testes induced testicular toxicity with several reproductive toxicants." *J Toxicol Sci* **30**(2): 111-126.

- Yamanaka, C., M. C. Lebrethon, E. Vandersmissen, A. Gerard, G. Purnelle, M. Lemaitre, S. Wilk and J. P. Bourguignon (1999). "Early prepubertal ontogeny of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion: I. Inhibitory autofeedback control through prolyl endopeptidase degradation of GnRH." *Endocrinology* **140**(10): 4609-4615.
- Yang, M. Y. and J. E. Fortune (2008). "The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes." *Biol Reprod* **78**(6): 1153-1161.
- Yin, Y., C. Lin, G. M. Veith, H. Chen, M. Dhandha and L. Ma (2012). "Neonatal diethylstilbestrol exposure alters the metabolic profile of uterine epithelial cells." *Dis Model Mech* **5**(6): 870-880.
- Yoshida, K., K. Maeda and Y. Sugiyama (2013). "Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 581-612.
- Yoshida, M., M. Takahashi, K. Inoue, S. Hayashi, A. Maekawa and A. Nishikawa (2011). "Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats." *Toxicol Pathol* **39**(5): 823-834.
- Younes, M. and N. Honma (2011). "Estrogen receptor beta." *Arch Pathol Lab Med* **135**(1): 63-66.
- Zachos, N. C., R. B. Billiar, E. D. Albrecht and G. J. Pepe (2003). "Developmental regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA expression in the baboon fetal ovary." *Biol Reprod* **68**(5): 1911-1917.
- Zachos, N. C., R. B. Billiar, E. D. Albrecht and G. J. Pepe (2004). "Regulation of oocyte microvilli development in the baboon fetal ovary by estrogen." *Endocrinology* **145**(2): 959-966.
- Zahid, M., E. Kohli, M. Saeed, E. Rogan and E. Cavalieri (2006). "The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity." *Chem Res Toxicol* **19**(1): 164-172.
- Zalewski, A., E. L. Cecchini and B. J. Deroo (2012). "Expression of extracellular matrix components is disrupted in the immature and adult estrogen receptor beta-null mouse ovary." *PLoS One* **7**(1): e29937.
- Zamek-Gliszczynski, M. J., K. A. Hoffmaster, K. Nezasa, M. N. Tallman and K. L. Brouwer (2006). "Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites." *Eur J Pharm Sci* **27**(5): 447-486.
- Zhang, F. P., M. Poutanen, J. Wilbertz and I. Huhtaniemi (2001). "Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice." *Mol Endocrinol* **15**(1): 172-183.
- Zhang, H., W. Zheng, Y. Shen, D. Adhikari, H. Ueno and K. Liu (2012a). "Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31): 12580-12585.
- Zhang, H. Q., X. F. Zhang, L. J. Zhang, H. H. Chao, B. Pan, Y. M. Feng, L. Li, X. F. Sun and W. Shen (2012b). "Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes." *Mol Biol Rep* **39**(5): 5651-5657.
- Zhao, Z., L. Fan and K. M. Frick (2010). "Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(12): 5605-5610.
- Zhu, B. T. and A. H. Conney (1998). "Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives." *Carcinogenesis* **19**(1): 1-27.
- Zimbelman, R. G. and J. W. Lauderdale (1973). "Failure of prepartum or neonatal steroid injections to cause infertility in heifers, gilts, and bitches." *Biol Reprod* **8**(3): 388-391.
- Zuckerman, S. (1951). "THE NUMBER OF OOCYTES IN THE MATURE OVARY." *Recent Progress in Hormone Research* **6**: 63-109.

Résumé

L'ovaire est au cœur de la physiologie de la reproduction féminine. Il est à la fois à l'origine des ovocytes nécessaires à la fécondation et acteur des régulations paracrines et endocrines du système reproducteur. Les ovocytes de l'ovaire sont groupés en amas bordés de cellules somatiques et d'une membrane basale, formant les cordons ovariens. Ces cordons ovariens se fragmentent pour former les follicules ovariens. Cette fragmentation se déroule sur une courte période (*in utero* chez la femme et juste après la naissance chez les rongeurs) et fait intervenir une vague de mort cellulaire programmée touchant les ovocytes pendant leur méiose et un remodelage de la membrane basale. La formation des follicules est une période cruciale du développement ovarien puisque le stock de follicules formés à l'issue de ce processus est non renouvelable. Son altération peut donc être à l'origine de troubles de la fonction de reproduction chez le futur adulte. Il existe une fragile homéostasie œstrogénique en place au moment de la formation folliculaire : chez la femme, l'ovaire se développe *in utero*, sous l'influence des œstrogènes circulants maternels et la production ovarienne fœtale. Chez les rongeurs, les follicules se forment lors de la levée de l'imprégnation hormonale maternelle au moment de la naissance.

Nous nous sommes donc attachés à comprendre comment le 17β -œstradiol (E2), œstrogène endogène, pouvait contribuer à la mise en place des follicules. Pour cela, des ratte Sprague-Dawley ont été traitées pendant la période de formation des follicules avec de l'E2 à différentes doses.

Au cours de mon étude, j'ai démontré que le traitement de ratte par des œstrogènes entre leur naissance et 3 jours induisait une réduction dose-dépendante de leur nombre d'ovocytes. Bien que le traitement entrave le développement normal du système de détoxification hépatique et ovarien, l'animal est capable d'accroître ses capacités d'élimination du traitement. Ces capacités sont toutefois insuffisantes pour bloquer les effets des œstrogènes. Quelle que soit la dose d'E2 utilisée, la puberté est plus précoce chez les femelles exposées mais toutes sont fertiles, au moins transitoirement. Mais le traitement induit une dégradation rapide des capacités reproductives. L'ovaire est cependant altéré de façon différente en fonction de la dose. L'E2 modifie la dynamique folliculaire chez l'adulte, longtemps après l'arrêt du traitement. Si une forte dose d'E2 réduit la survie des ovocytes lors de la formation des follicules et conduit à une infertilité secondaire due à un dysfonctionnement général du tractus reproducteur, une dose faible n'affecte pas la survie des ovocytes à court terme mais conduit à une sénescence reproductive précoce vraisemblablement d'origine ovarienne. La source de ces troubles pourrait résider dans les effets précoces de l'exposition à E2 : cette molécule altère le transcriptome ovarien et induit de nombreuses lésions de l'ADN des cellules ovariennes. Les conséquences d'une exposition aux œstrogènes pendant la période critique de formation folliculaire dépendent fortement de la dose : une dose sans effet sur la survie des ovocytes est malgré tout capable d'induire d'importantes anomalies.